

**Funktionelle und strukturelle Untersuchungen von Häm-
Peptid/Protein-Komplexen: Ein Beitrag zur Aufklärung der
Häm-vermittelten Regulation von Proteinen im Organismus**

**Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
„doctor rerum naturalium“ (Dr. rer. nat.)**

**vorgelegt dem Rat der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät
der Friedrich-Schiller- Universität Jena**

von Diplom-Biochemiker Toni Kühl

geboren am 19.03.1985 in Eberswalde-Finow

Gutachter:

1. Prof. Dr. Diana Imhof, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn
2. Prof. Dr. Stefan H. Heinemann, Friedrich-Schiller-Universität Jena
3. Prof. Dr. Ines Neundorff, Universität zu Köln

Tag der öffentlichen Verteidigung: 07.10.2013

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Einfluss von Häm auf die Funktion von Proteinen.....	2
2.1	Häm – Struktur und Eigenschaften.....	2
2.2	Bedeutung von Häm für Proteine.....	5
2.2.1	Häm als essentieller Bestandteil in Proteinen	5
2.2.2	Häm als regulatorischer Effektor von Proteinfunktionen.....	10
2.3	Pathophysiologische Folgen von Häm-assoziierten Fehlregulationen	19
2.3.1	Porphyrien und Anämien	19
2.3.2	Neurodegenerative Erkrankungen	20
2.3.3	Alter.....	22
2.3.4	Hämolyse und zerebraler Vasospasmus/Subarachnoidalblutungen.....	22
2.3.5	Krebs.....	25
2.4	Charakterisierung der Hämbindung an Proteine	27
2.4.1	Häm-bindende versus Häm-regulatorische Motive.....	29
2.4.2	Charakteristische Merkmale Häm-bindender Motive.....	29
2.4.2.1	Cytochrom-P450-Proteine.....	29
2.4.2.2	Peroxidasen und Katalasen	30
2.4.2.3	Cytochrom c	31
2.4.2.4	Weitere Motive.....	32
2.4.3	Charakteristische Merkmale Häm-regulatorischer Motive	33
2.4.3.1	CXXCH-Motive	33
2.4.3.2	CP-Motive.....	34
2.4.3.3	Weitere Motive.....	36
3	Zielstellung	37
4	Materialien und Methoden	38
4.1	Materialien.....	38
4.1.1	Chemikalien und Lösungsmittel	38
4.1.2	Puffer und Lösungen	40
4.1.2.1	Ansetzen der Häminlösung.....	40
4.1.2.2	Herstellung der Peptid-Hämin-Komplexe	41
4.1.2.3	Verwendete Puffer	41
4.2	Methoden	41
4.2.1	Festphasenpeptidsynthese	41
4.2.1.1	Darstellung einer Peptidbibliothek – „Split and Pool“-Methode.....	41
4.2.1.2	Darstellung der Peptide	42
4.2.2	Screening und Analyse einer Peptidbibliothek mit Hämin	44
4.2.2.1	Screening einer Peptidbibliothek mit Hämin.....	44
4.2.2.2	Analyse einer Peptidbibliothek mit Edman-Abbau.....	44

4.2.2.3	Analyse einer Peptidbibliothek mit Massenspektrometrie-gekoppeltem partiellem Edman-Abbau	46
4.2.3	Charakterisierung und Aufreinigung synthetisierter Peptide	47
4.2.3.1	Semipräparative HPLC	47
4.2.3.2	Analytische HPLC	48
4.2.3.3	Massenspektrometrie	48
4.2.3.4	Aminosäureanalyse	48
4.2.3.5	Dünnschichtchromatografie	49
4.2.4	Analytik und Strukturaufklärung der Hämin-Peptid-Interaktion	49
4.2.4.1	UV/Vis-Spektroskopie und quantitative Auswertung	49
4.2.4.2	Kompetitive Bindungsstudien	50
4.2.4.3	Ramanspektroskopie	51
4.2.4.4	Kernresonanzspektroskopie	51
4.2.5	Vorhersage und Analyse potentieller Häm-regulierter Proteine	52
4.2.5.1	Vorhersage potentieller Häm-regulierter Proteine an Hand vorgegebener Sequenzen	52
4.2.5.2	Dipeptidylpeptidase-8-Inhibitortest	52
5	Ergebnisse und Diskussion	54
5.1	Screening einer Peptidbibliothek auf die Interaktion mit Hämin	54
5.1.1	Konstruktion und Screening der Peptidbibliothek	54
5.1.2	Identifikation Häm-assoziiierter Sequenzen: Klassische Edman-Sequenzierung versus PED-MS-Methode	57
5.1.3	Spezifität der Häminbindung	59
5.1.4	Häminbindekapazität ausgewählter Peptide	63
5.1.5	Vorhersage potentiell neuer Häm-regulierter Proteine	70
5.2	Klassifizierung der Hämin-Peptid/Protein-Interaktion	73
5.2.1	Auswahl Cys-basierter Peptide	74
5.2.2	Bindekapazität Cys- und Cys-Pro-haltiger Motive	76
5.2.3	Strukturuntersuchungen an verschiedenen Hämin-Peptid-Komplexen	82
5.2.4	NMR-Struktur eines potentiellen HRMs aus Dipeptidylpeptidase 8	86
5.3	Vorhersage und Analyse potentieller HRMs	90
5.3.1	Charakterisierung des Bindemotivs in Dipeptidylpeptidase 8	90
5.3.2	Einfluss von Hämin auf die Funktion von Dipeptidylpeptidase 8	92
6	Zusammenfassung	95
7	Summary	99
8	Abkürzungsverzeichnis	103
9	Literaturverzeichnis	106
	Danksagung	119
	Lebenslauf	120
	Ehrenwörtliche Erklärung	123

1 Einleitung

"Das geheime Leben des Häms in der Regulation diverser biologischer Prozesse" heißt es in der Überschrift des von Li Zhang veröffentlichten Buchs zum Thema "Biologie des Häms" ("Heme Biology"). [1] Lange Zeit war das kleine Biomolekül vorrangig im Zusammenhang mit Proteinen wie Hämoglobin, Cytochromen oder Peroxidasen als prosthetische Gruppe bekannt, die für deren Funktionalität essentiell war. Dass es aber noch eine andere "geheime" Bedeutung haben könnte, ist vor 20 Jahren das erste Mal nachgewiesen worden. Die Lokalisierung einer kurzen Sequenz auf der Oberfläche des Proteins 5-Aminolevulinatsynthase 2 ermöglichte dem Hämmolekül eine Interaktion mit dem Protein und verursachte dadurch einen verringerten Import in die Mitochondrien, wo es normalerweise seine physiologische Funktion für die Hämsynthese ausübt. Die Entdeckung dieses Häm-regulierten Motivs ließ nicht lange auf weitere Vertreter warten, so dass mittlerweile verschiedene Proteine bekannt sind, die als Hämsensoren fungieren können. Die Effekte reichen dabei von Einflüssen auf die Proteinbiosynthese, über Regulationen von Ionenkanalaktivitäten bis hin zu Reaktionen im Immunsystem und Entzündungsprozessen. Dennoch ist die bisherige Datenlage leider nur wenig aussagekräftig für die Analyse von beliebigen Proteinen auf mögliche Ansatzpunkte für die Regulation durch Hämin. Klassifizierende Ansätze existieren in großem Umfang für die oben genannten Häm-bindenden Proteine.

Für die meisten der bisher diskutierten Häm-regulierten Motive ist das auffälligste Merkmal ein Sequenzabschnitt gewesen, der unmittelbar aufeinanderfolgend Cys und Pro enthält. Genauere Untersuchungen zeigten jedoch, dass nicht jedes dieser CP-Motive zwangsläufig Häm binden muss. Aus Untersuchungen an Häm-bindenden Proteinen ist bereits bekannt, dass auch weiter entfernter Aminosäuren einen Beitrag zur Bindung des Häms beisteuern können. Auf welche Größe sich das tatsächlich für Häm-regulierte Motive erstrecken lässt, ist jedoch noch unklar.

In der vorliegenden Arbeit wird die Charakterisierung der den Häm-kordinierenden Rest umgebenden Aminosäuren mit Hilfe des Screenings einer kombinatorischen Peptibibliothek vorgenommen. Es sollen damit Aussagen zu wichtigen Positionen für die Bindung des Hämins in Häm-regulierten Motiven gemacht werden. Ziel sollte es sein, mit diesen Ergebnissen Unterschiede sowie Gemeinsamkeiten unterschiedlicher Häm-bindender Sequenzen aufzuklären und näher zu charakterisieren. Mit den zu ermittelnden Ergebnissen sollte eine Vorhersage potentiell Häm-bindender Protein ermöglicht werden, um so deren Validität und Aussagekraft zu unterstützen.

2 Einfluss von Häm auf die Funktion von Proteinen

2.1 Häm – Struktur und Eigenschaften

Häm ist eine in der Natur auftretende, einzigartige Komplexverbindung, die die Funktion zahlreicher Proteine auf unterschiedlichen Wegen beeinflusst. In der Literatur wird der Begriff Häm für verschiedene Komplexierungs- und Substituentenmuster verwendet, da er nach IUPAC vereinfacht als Eisen-Porphyrin-Komplex definiert wurde. [2] Aus biosynthetischen Gründen kann unter Häm vorrangig Eisen(II)-Protoporphyrin IX verstanden werden. Es besteht aus einem mit charakteristischen Substituenten modifizierten Tetrapyrrolringsystem, dem sogenannten Porphyringerüst, und einem von diesem über vier Stickstoffatome koordinierten zweifach positiv geladenen Eisen (Fe^{II})-Ion (Abb. 1). Diesbezüglich findet man in der Literatur häufig auch die dreifach positiv geladene Form des Fe^{III} -Ions mit der Bezeichnung "Häm". Korrekterweise charakterisiert Häm jedoch ausschließlich Fe^{II} -Protoporphyrin IX, während die oxidierte Variante als Hämin bezeichnet wird. Letztere findet man auf Grund ihrer positiven Ladung häufig als Salz mit Chlorid-Ionen oder in Lösung in einem pentakoordinierten Zustand mit einem axialen Chloro-Liganden. [2] Vergleichbar hierzu sind die Hämatine, die an der fünften Koordinationsstelle des Fe^{III} -Ions einen Hydroxo-Liganden besitzen. [2] Strukturell ähnlich zu Häm sind die natürlichen Chlorophylle und Bakteriochlorophylle, sowie der Kofaktor 430, die durch Einbindung eines Magnesium-, Zink- oder Nickel-Ions in ihr Tetrapyrrolringsystem ihre biologisch relevante Form erlangen. [3, 4] Häm und Hämin besitzen durch ihre Struktur eine hohe Komplexität bezüglich ihrer möglichen chemischen Wechselwirkungen. Man findet mit dem aromatischen Porphyrinring, den Methyl- und den Vinylgruppen Bereiche im Molekül, die sehr hydrophob sind. Auf der anderen Seite sind das $\text{Fe}^{\text{II/III}}$ -Ion sowie die Propionat-Seitenketten sehr hydrophile Bestandteile. Es besteht daher die Möglichkeiten zur Ausbildung von sowohl hydrophoben Interaktionen, einschließlich " π -stacking"-Effekten, als auch Salzbrücken und Wasserstoffbrückenbindungen. Je nach Oxidations- und Spinzustand des Zentralions können hieran bis zu 6 Liganden über koordinative Bindungen gebunden sein. Dabei werden vier Bindestellen bereits durch Stickstoff aus dem Porphyringerüst abgedeckt, so dass noch bis zu 2 weitere Liganden mit Häm koordinieren können. Diese werden sehr häufig durch Heteroatome wie Sauerstoff, Stickstoff oder Schwefel als klassische Elektronendonatoren besetzt. [5]

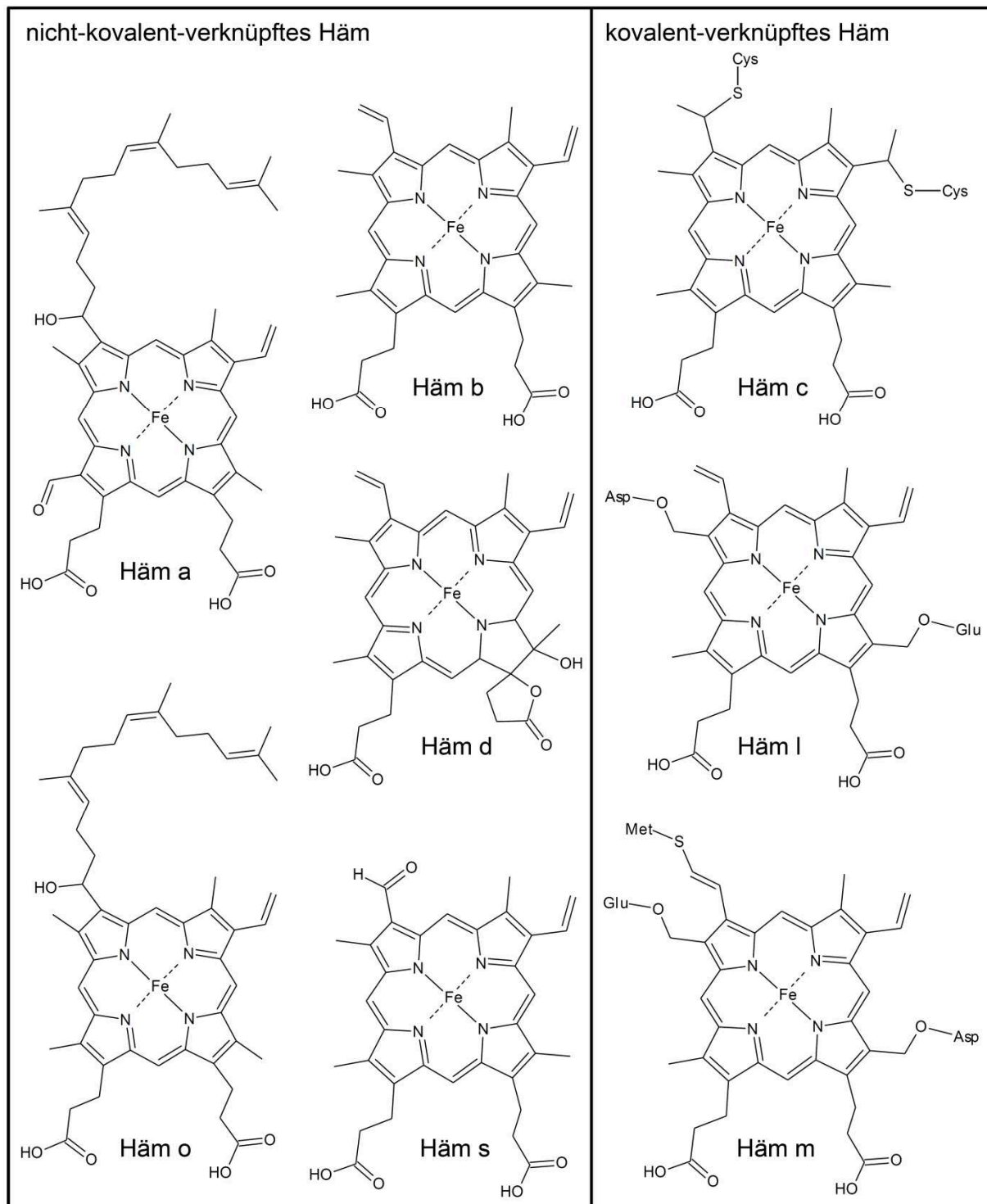


Abb. 1: In der Natur vorkommende strukturelle Varianten von Häm, unterteilt in die Art der Bindung zum Protein. Modifiziert nach [6].

Ausgehend von der Biosynthese des Häms auf der Basis des Protoporphyrin IX-Gerüsts (Häm b, Abb. 1) kann man dennoch verschiedene Subtypen im Organismus vorfinden, die strukturell weiteren Modifikationen unterzogen wurden (Abb. 1). [6] Man unterscheidet in mit dem Protein kovalent-verknüpfte (Häm a, b, d, o, s) und nicht-kovalent-verknüpfte Häm-Moleküle (Häm c, I, m) (Abb. 1). Als essentieller Bestandteil des roten Blutfarbstoffs

Hämoglobin ist dabei Häm b der prominenteste Vertreter aller Häm-Moleküle. Es tritt außerdem in zahlreichen anderen Proteinen auf, z. B. Myoglobine, Katalasen und Cytochrom-P450-Proteine. Unter den nicht-kovalent-verknüpften Häm-Molekülen ist weiterhin das Häm a ein erwähnenswerter Vertreter. In aeroben Organismen ist es vorrangig in der Cytochrom-c-Oxidase (Komplex IV) der Atmungskette lokalisiert und wird über die Zwischenstufe Häm o gebildet. [6] Häm d als ebenfalls nicht-kovalent-verknüpfte Variante findet man in terminalen Oxidasen der Atmungskette verschiedener Bakterien, [7] Häm s dagegen als Bestandteil des Hämoglobins einiger mariner Würmer. [6]

Ein anderer, in der Natur weit verbreiteter Häm-Typ ist das Häm c, das durch kovalente Verknüpfungen der Vinylgruppen an Cysteinreste eines Proteins gekennzeichnet ist (Abb. 1). Vorrangig vertreten ist es in den Cytochrom-c-Proteinen. Eine weitere Form der kovalenten Verknüpfung weisen Häm l und m auf, die in Anlehnung an ihr Vorkommen in der Lactoperoxidase (Häm l) und Myeloperoxidase (Häm m) benannt worden sind. In beiden Fällen ist die Veresterung des Porphyringerüsts mit Aspartat- und Glutamat-Seitenketten charakteristisch. In der Myeloperoxidase findet sich darüber hinaus noch eine Sulfonium-Bindung einer Vinylgruppe zu einer Methionin-Seitenkette des Proteins. [6]

Charakteristisch für alle diese Komplexe ist ein auffälliges Absorptionsspektrum im Bereich des sichtbaren Lichts (Abb. 2). Im Allgemeinen weisen Metalloporphyrine ein Muster aus 3 bis 4 Banden im Bereich zwischen 350 und 800 nm auf, die als Q- und B-Banden bezeichnet werden. [8, 9] In Anlehnung an die Entdeckung durch Jacques-Louis Soret, nach der Hämoglobin im Blut eine Absorption im Bereich von ~400 nm zeigt, findet man für die auffällige B-Bande auch häufig die Bezeichnung Soret-Bande. [10] Abhängig vom Zentralatom liegt diese Bande in verschiedenen Metalloporphyrinen im Bereich zwischen 350 und 450 nm. [8, 11] IUPAC definiert die Soret-Bande als starke Absorptionsbande im blauen Bereich eines Absorptionsspektrums eines Häm-Proteins. [12]

Nach dem Vier-Orbital-Modell von Gouterman *et al.* besitzt jedes Metalloporphyrin 4 Banden: 2 B-Banden und 2 Q-Banden. [8] In einigen Fällen beobachtet man jedoch nur eine der beiden B-Banden, die durch Überlagerung der geringer intensiven zweiten B-Bande eine Verbreiterung erfährt (Abb. 2). [4, 13] Dazu bathochrom verschoben befinden sich die beiden aufeinanderfolgenden Q-Banden zwischen 500 und 800 nm. [4, 8]

Im Speziellen sind sowohl für Häm b als auch für Hämin Absorptionsmaxima der Soret-Bande bei ~400 nm beschrieben (Abb. 2). [11, 14, 15] Ebenso findet sich ein Q-Bandenmuster in beiden Fällen wieder. Die exakte Lage der Banden ist jedoch abhängig von verschiedenen Parametern, u. a. pH-Wert, Lösungsmittel, Oxidations- und Spinzustand des Fe-Ions. [11, 16]

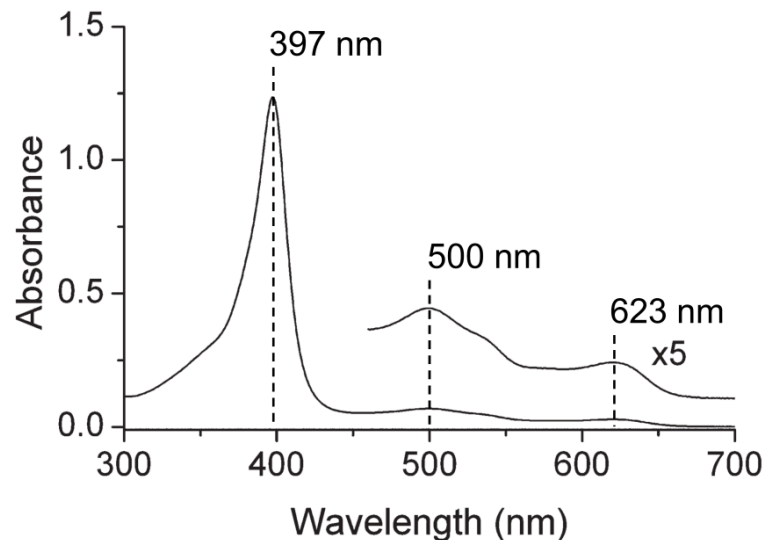


Abb. 2: Häm in (10 µM) in Methanol zeigt eine deutliche B-Bande (397 nm) und eine Q-Bande (500 nm). Für die Entstehung der Bande bei 623 nm wird eine Ring-zu-Metall-Ladungsverschiebung vermutet. Modifiziert nach [15].

Neben seiner auffälligen Struktur und dem besonderen, vielfältig modulierbaren, spektroskopischen, aber auch elektronischen Verhalten stellt es eines der zentralen Moleküle für die Funktion zahlreicher, zum Teil bereits erwähnter Proteine dar. Dieser Aspekt soll im folgenden Abschnitt detaillierter beleuchtet werden.

2.2 Bedeutung von Häm für Proteine

Etwa 80% des im menschlichen Körper verteilten Häms wird in den roten Blutzellen hergestellt und findet sich daraufhin dort auch wieder; weitere 15% werden durch die Leber abgedeckt und die restlichen 5% teilen sich auf andere Gewebe auf. [17] Dabei kann die Rolle von Häm in Verbindung mit Proteinen sehr unterschiedlich sein, weshalb man grundlegend zwei Typen der Interaktionen voneinander differenzieren sollte. Auf der einen Seite handelt es sich um die sogenannten Hämoproteine, die Häm als essentiellen Baustein ihrer Proteinarchitektur, sowie zur Ausprägung ihrer Funktion benötigen. Auf der anderen Seite finden sich die Häm-regulierten Proteine wieder, die zunächst vollständig funktional sind, aber durch temporäre Wechselwirkung ihrer Sequenz mit Häm eine Modulation ihrer Aktivität erfahren können.

2.2.1 Häm als essentieller Bestandteil in Proteinen

Die Integration von Häm in Proteine ist in vielen Fällen essentiell für deren Funktion. Dabei werden sowohl klassische Prozesse wie der Gastransport und die Bindung von Gasen (z. B.

O₂, NO, CO), als auch zentrale Aspekte in katalytischen Vorgängen oder die Übertragung von Elektronen durch gebundenes Häm realisiert (Abb. 3). Eine Auswahl wichtiger Häm-enthaltender Proteine soll im Folgenden aufgeführt werden.

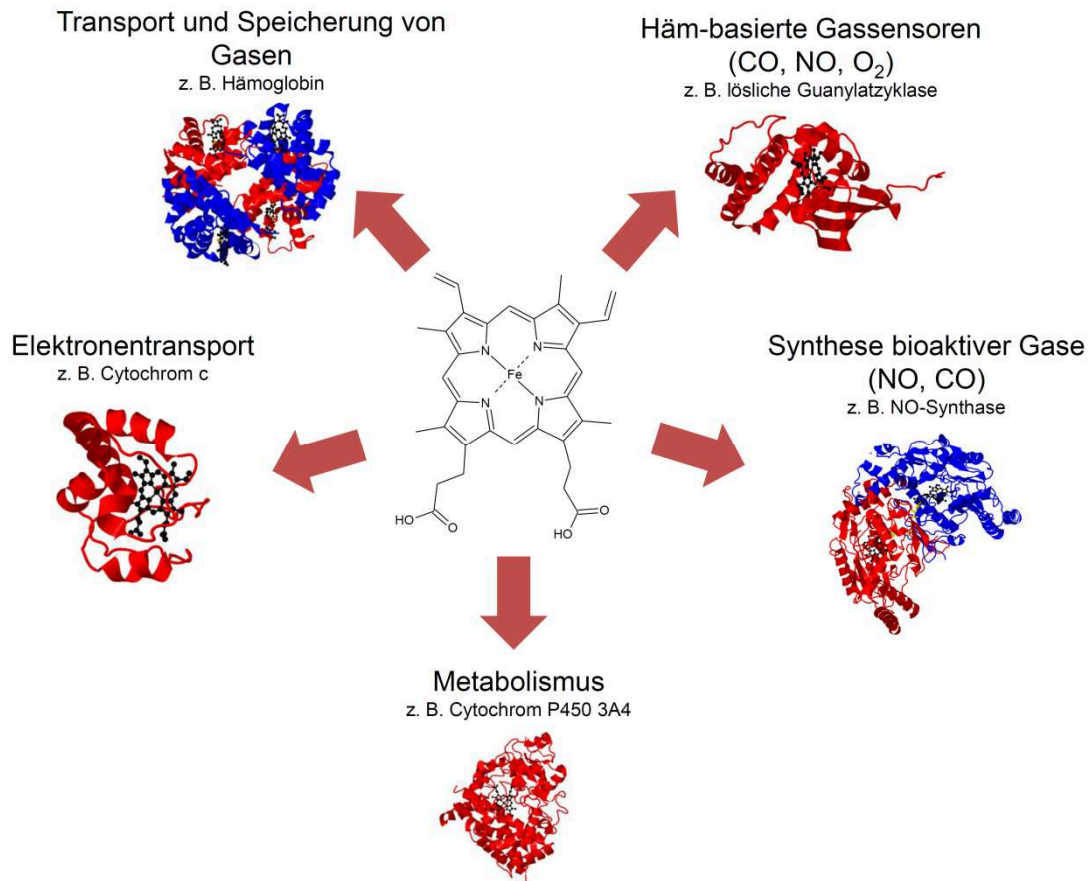


Abb. 3: Häm ist als prosthetische Gruppe und funktionsgebende Einheit von Proteinen in verschiedene Prozesse involviert. (Pdb-Nummern der dargestellten Proteine: Hämoglobin aus *Homo sapiens* - 1gzx, Cytochrom c aus *Equus caballus* - 1hrc, verwandte Sauerstoff-bindende H-NOX-Domäne zur löslichen Guanylatzyklase aus *Caldanaerobacter subterraneus* - 1u56, eNOS aus *Bos taurus* - 2nse, Cystathionin-β-Synthase aus *H. sapiens* - 1jbq, Cytochrom P450 3A4 aus *H. sapiens* - 1w0e)

Gastransport und -speicherung

Die bekanntesten Vertreter in Bezug auf Häm als Vermittler für den Gastransport repräsentieren die Globine, zu denen neben Hämoglobin auch Myoglobin, Neuroglobin sowie Leghämoglobin gehören. [18-22] Generelle sind sie die Hauptklasse der Proteine, die für den Transport lebensnotwendiger Gase wie Sauerstoff von und zur Zelle und/oder die Speicherung dieser verantwortlich sind. Charakteristisch ist die Einbindung von bis zu vier Häm-Molekülen in die Proteinstruktur, durch die die Anlagerung von Sauerstoff an das Fe^{II}-Zentralatom des Häms ermöglicht wird. [23] Das in den Erythrozyten vorkommende Hämoglobin bindet den Hauptanteil des im Körper vorkommenden Häms.

Häm-basierte Gassensoren

Eine andere Funktion der Bindung von Gasen findet sich in den Häm-basierten Gassensoren wieder (Abb. 4). Sie tragen Häm als stabil gebundene, prosthetische Gruppe in einer regulatorischen Domäne, über die sie die Bindung von Gasen (CO, NO, O₂) realisieren. Dieses Signal erzeugt eine Aktivitätsänderung im katalytischen Teil des Proteins. An Hand charakteristischer Strukturen unterscheidet man vier Haupttypen der Häm-basierten regulatorischen Gassensoren: die Per-Arnt-Sim (PAS)-Domäne, die Globin-gekoppelten Sensoren, die CoxA-Hämbindedomäne und die Häm-NO-bindenden Proteine. Diese können mit verschiedenen Funktionen der katalytischen Domäne gekoppelt sein. [5, 24] Charakteristische Vertreter der Häm-basierten Gassensoren sind neuronales-PAS-Protein 2 (NPAS2, *Mus musculus*), das in die circadiane Rhythmik involviert ist, und CoxA (*Rhodospirillum rubrum*), das für die Regulation der Expression der *coo*-Operons verantwortlich ist. [25, 26] In beiden Fällen handelt es sich um Transkriptionsfaktoren, die ein Häm in der jeweils charakteristisch gefalteten Hämbindetasche besitzen. Ihre Aktivität kann darüber durch den Einfluss von Gasen wie CO moduliert werden. [25, 27] Weiterhin sollen die nachfolgend beschriebenen, humanen Proteine lösliche Guanylatzyklase und Cystathionin-β-Synthase (CBS) genannt sein, die in Abhängigkeit von ihrer katalytischen Domäne verschiedene Funktionen tragen.

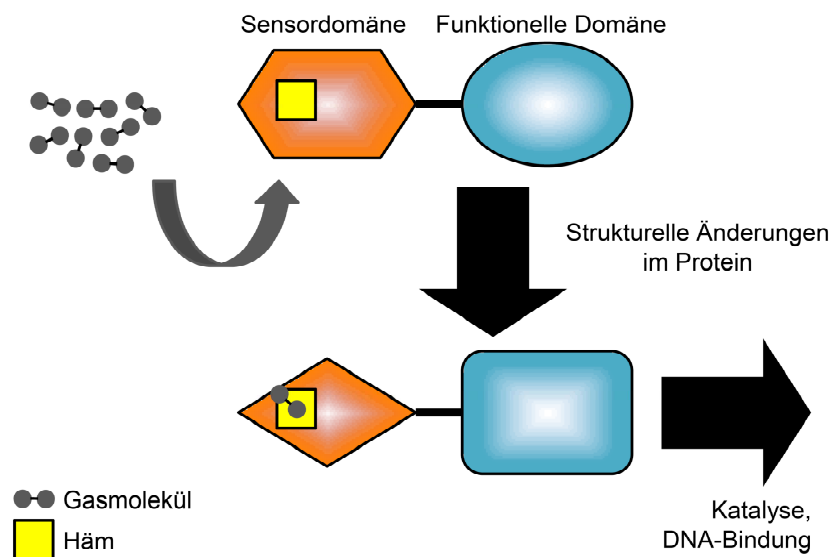


Abb. 4: Modell zur Modulation der Aktivität von Häm-basierten Gassensoren (CoxA, NPAS2, Cystathionin-β-Synthase, lösliche Guanylatzyklase) durch zweiatomige Gase (CO, NO, O₂). Nach Bindung der Gasmoleküle an Häm in der Sensordomäne kommt es hier zur Strukturänderung, die wiederum eine Strukturänderung in der funktionellen Domäne bewirkt. Daraus resultiert eine veränderte Aktivität der funktionellen Domäne. Modifiziert nach [25].

Die Häm-bindende Cystathionin- β -Synthase ist eine Lyase, die die Kondensation von Serin und Homocystein zum Zwischenprodukt Cystathionin im Schwefelmetabolismus katalysiert. Durch äußere Einflüsse in Form von pH-Änderungen oder Gasen wie CO oder NO erkennt man signifikante Änderungen der Enzymaktivität. Dabei ist die reduzierte Form des Häms in der regulatorischen Domäne weniger aktiv als die oxidierte. Darüber hinaus führen die Gase NO und CO ausschließlich beim Fe(II)-Häm zu einer Inhibition des Enzyms. [28]

Die lösliche Guanylatzyklase wird unter Anlagerung eines Moleküls NO an das Häm des Enzyms aktiviert. Infolgedessen wird vermehrte cGMP gebildet, das als second messenger fungiert und Protein Kinase G aktiviert. Die Phosphorylierung nachgeschalteter Proteine führt anschließend zur Kontrolle verschiedener Prozesse, die unter anderem in das Herz-Kreislauf- sowie das Nervensystem involviert sind. [29] Neben der Empfindlichkeit für NO gibt es auch Befunde, die über eine (geringere) Sensitivität des Enzyms für CO berichten. [30, 31]

Häm-vermittelte enzymatische Katalyse

Das zur Aktivierung verschiedener Häm-basierter Gassensoren benötigte NO kann von einem ebenfalls Häm-tragenden Enzym, der NO-Synthase (NOS) gebildet werden. Je nach Vorkommen kann man dabei drei Formen unterscheiden: induzierbare NOS (iNOS), endotheliale NOS (eNOS) und neuronale NOS (nNOS). [32] Ihre Aufgabe ist die Katalyse der Reaktion von Arginin zu Citrullin unter Freisetzung eines Moleküls NO. [33] Im Verlauf der Reaktion tritt Häm im Komplex mit NO sowohl in reduzierter als auch in oxidiert Form auf. Dabei erfolgt die Freisetzung vorrangig durch Fe^{III}-Häm. Im Gegensatz dazu führt reduziertes Häm primär zur Oxidation von NO zu Nitrat-Ionen unter Verwendung von Sauerstoff. [32]

Weitere Enzyme, in denen Häm eine wichtige Rolle als Katalysator spielt, sind die Peroxidasen, die Cytochrom-P450-Proteine und andere Vertreter wie z. B. die Nitrat-Reduktasen und die Häm-Oxygenasen. [34-37]

Eine Hauptklasse der Hämoproteine in der Leber aber auch in verschiedenen Gehirnnarealen stellen die Cytochrom-P450-Proteine dar. [38] Es handelt sich bei ihnen um Monooxygenasen, die eine wichtige Rolle im oxidativen, peroxidativen und reduktiven Metabolismus zahlreicher endogener Substanzen (Steroide, Gallensäuren, Fettsäuren u. a.) spielen. Für viele dieser Enzyme ist aber auch bekannt, dass sie ein breites Spektrum körperfremder Chemikalien, wie Medikamente, Alkohole und Umweltgifte, umsetzen. [39] Die Rekrutierung des Sauerstoffs zur Oxidation des Substrats sowie der dafür notwendige Transfer der Elektronen werden im Enzym durch Häm realisiert. Während des Reaktionszyklus liegt das Fe-Ion in den Oxidationszuständen II bis IV vor, wobei Fe^{III} den Ruhezustand repräsentiert. [34, 35]

Peroxidasen und Katalasen stellen eine weitere große Familie von Enzymen dar, von denen die meisten unter Verwendung von Häm in ihrem aktiven Zentrum arbeiten. Sie gewährleisten die Umsetzung von Wasserstoffperoxid zu weniger reaktiven Produkten. [36, 40] Während jedoch Katalasen Wasser und Sauerstoff bei der Umsetzung von Wasserstoffperoxid bilden, wird durch Peroxidasen neben der Entstehung von Wasser ein weiteres Substrat (z. B. Alkohol, kleines Protein, auch Wasserstoffperoxid) als Elektronendonator oxidiert. [40, 41] Die Bedeutung des Fe^{III} -Häms liegt in der Rekrutierung des Wasserstoffperoxids unter Ausbildung eines hochvalenten Eisen-Sauerstoff-Intermediats, das dann zur nachfolgenden Oxidation des jeweiligen Substrats führt. [42, 43]

Im Rahmen der katalytischen Funktionen von Häm in Proteinen sollen auch die Hämoxygenasen erwähnt werden. Ihre Rolle ist der kontrollierte Abbau von Häm zu Biliverdin, CO und Fe^{2+} , indem freigesetztes Häm nach Bindung an das Protein die Sauerstoffrekrutierung und damit den eigenen Abbau ermöglicht (Abb. 5). [44]

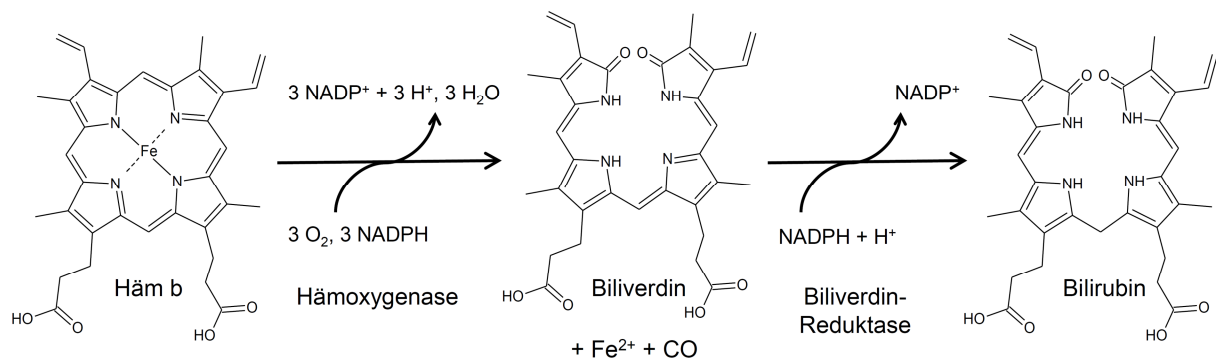


Abb. 5: Abbau von Häm. Charakteristische Produkte sind die farbigen Abbauprodukte Biliverdin und Bilirubin, Fe^{II} -Ionen und Kohlenstoffmonoxid. Modifiziert nach [45].

Elektronentransport

Die Funktion des Häm-tragenden Cytochrom b_5 basiert auf dem Elektronentransport, der mittels Häm durch Reduktion des Fe^{III} -Ions gewährleistet wird. [46-48] Gleichzeitig kommt Cytochrom b_5 als Bestandteil anderer Proteine (z. B. Nitratreduktase, mitochondriale Sulfitoxidase, Flavocytochrom b_2) vor, wo es ebenfalls mit Hilfe der integrierten Hämfunktion den Transfer von Elektronen aus vorangegangenen Reaktionen der Enzyme ermöglicht. [37, 49] Im klassischen Cytochrom b_5 , aber auch z. B. im Flavocytochrom b_2 , erfolgt die anschließende Elektronenübertragung zur Regeneration des Enzyms auf Cytochrom c. [49, 50] Auch Cytochrom c macht sich die Redoxaktivität des Fe-Ions im Häm zunutze. Vergleichbar zum Cytochrom b_5 wird es dem kleinen Protein damit ermöglicht, Elektronen aufzunehmen und in der Atmungskette dieses entlang der Membran zu seinem Zielort, der Cytochrom c Oxidase, zu transportieren. [50] Dennoch unterscheiden sich beide Cytochrome in der Bindung des Häms voneinander. Während Cytochrom b_5 ein Häm b trägt,

besitzt Cytochrom c ein Häm c, das durch kovalente Bindungen der Propionatseitenketten an das Protein gebunden ist. [6]

2.2.2 Häm als regulatorischer Effektor von Proteinfunktionen

Die Bedeutung der erwähnten, prominenten, Häm-enthaltenden Proteine (vgl. Kapitel 2.2.1) lässt jedoch das Vorhandensein und die Funktion von "freiem" Häm in der Zelle weitestgehend unbeachtet. Dennoch gibt es zahlreiche Hinweise in der Literatur, dass in der Natur ein Häm-Pool ($\sim 0,1 - 1,0 \mu\text{M}$) in der Zelle existieren muss, der zunächst nicht gebunden vorliegt. [51, 52] Dieses „freie“ Häm hat nicht nur für die Synthese der Hämoproteine eine bedeutende Rolle, sondern wurde in den letzten zwei Jahrzehnten vermehrt für zahlreiche andere Proteine als Regulator ihrer Aktivität diskutiert und bestätigt. [53-58] Unter Berücksichtigung dieser Aspekte sollte aber neben dem bisher nur vermuteten, intrazellulären Häm-Pool auch der Anteil extrazellulären freien Häms erwähnt sein. [52] Dort findet man Häm üblicherweise an Proteine gebunden vor, wobei hier die klassischen Träger neben Hämoglobin die Proteine Albumin und Hemopexin sind. Es sollte sich daher kein oder wenig „freies“ Häm außerhalb der Zellen finden. Unter verschiedenen Umständen kann es aber zu gesteigerten Hämkonzentrationen im Gewebe kommen. Einer der Gründe hierfür sind zum Beispiel Blutungen nach Gefäßverletzungen. In diesem Fall lässt sich in den entstehenden Hämatomen ein Wert von Häm und hier vorrangig dessen oxidierte Form Hämin von $> 350 \mu\text{M}$ nachweisen. [52] Die Freisetzung von Hämoglobin aus den Erythrozyten nach einer Gefäßverletzung führt zu einer Oxidation des Fe^{II} -Ions im Zentrum des Häms, das zur Entstehung des Methämoglobins führt. Die Nachteile dieser Oxidation sind folgende: zunächst einmal korreliert sie zur Entstehung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS). Parallel dazu kommt es durch die Oxidation zur Freisetzung des Hämins aus Methämoglobin, das schwächer als das reduzierte Häm an das Protein bindet. Folgen einer solchen Hämin-Freisetzung sowie die damit verbundene Entwicklung von ROS werden ausführlicher in Kapitel 2.3 diskutiert. Ähnliche Freisetzungsprozesse lassen sich auch für weitere intra- und extrazelluläre Hämoproteine nach Zelllyse diskutieren. Somit ist offensichtlich die Bindekapazität einiger Hämumgebungen in Proteinen für Hämin signifikant geringer. [52] Im Gegensatz dazu steht die erhöhte Bindekapazität von Fe^{III} -Häm für Cystein in Cytochrom-P450-Proteinen und NOS im Vergleich zu Fe^{II} -Häm. Unter der Voraussetzung, dass in der Umgebung des Cysteins nicht weitere signifikant bindungsstärkende Aminosäuren für die reduzierte Form des Häms im Protein existieren, findet sich hier der gegenteilige Effekt zum Hämoglobin. [59]

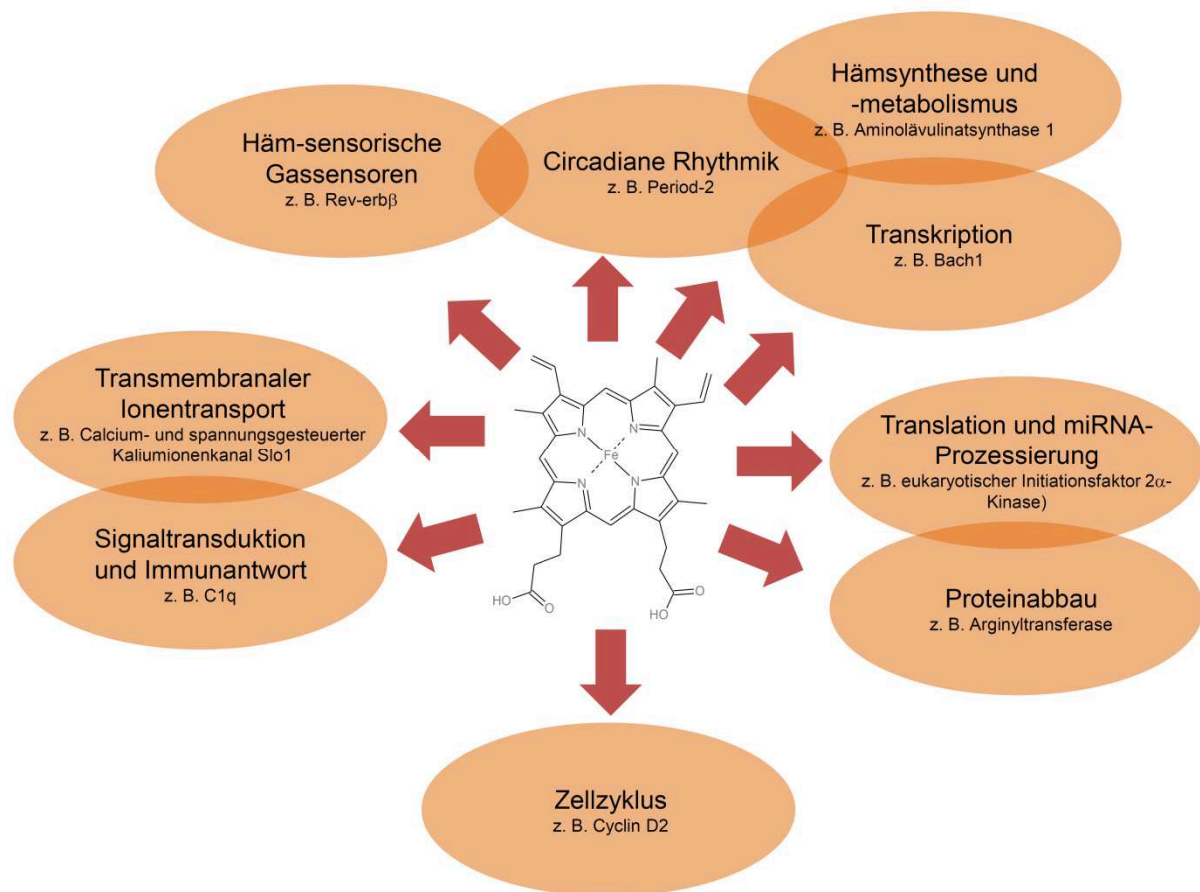


Abb. 6: Häm als regulatorischer Effektor von Proteinen ist in verschiedene Prozesse involviert. Diese überlagern zum Teil und beeinflussen sich gegenseitig.

Die Verfügbarkeit von Häm bzw. Hämin ist somit in verschiedenen physiologischen Situationen sowohl intra- als auch extrazellulär gegeben und ein regulatorischer Einfluss auf ein umfangreiches Repertoire an Proteinen naheliegend. Diese Effekte lassen sich auf verschiedenen Ebenen der Proteinsynthese, beim Proteinabbau, in der Signaltransduktion und der Ionenkanalregulation beschreiben, haben aber auch im Rahmen der Immunantwort, der Fähigkeit von Proteinen auf das Vorhandensein von zweiatomigen Gasmolekülen zu reagieren (vgl. Kapitel 2.2.1) und bei zahlreichen weiteren Prozessen eine große Bedeutung (Abb. 6). Die Wirkung solcher "Hämsensoren" ist vereinfacht in Abbildung 7 dargestellt. [25]

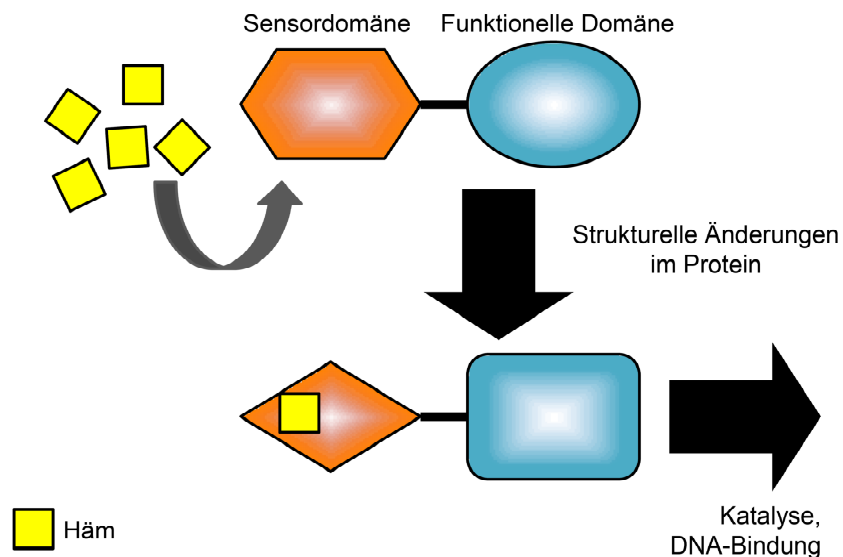


Abb. 7: Modell zur Modulation der Aktivität von Hämsensoren durch Häm. Nach Bindung des Hämmoleküls in der Sensordomäne des Proteins kommt es zur Strukturänderung dieser, was wiederum eine Strukturänderung in der funktionellen Domäne bewirkt. Dadurch kommt es zu einer veränderten Aktivität der funktionellen Domäne. Modifiziert nach [25].

Hämbiosynthese und -metabolismus

Zu hohe Mengen an freiem Häm ($> 1\text{-}10\ \mu\text{M}$) sind auf Grund der Bildung von ROS toxisch (vgl. Kapitel 2.3). [51] Daher müssen die Synthese und der Abbau des kleinen Biomoleküls streng kontrolliert sein. Die Biosynthese von Häm wird in acht Stufen in Mitochondrien und Zytoplasma durchgeführt. In nahezu allen Zellen kann sie kontrolliert werden (Abb. 8), indem die Mengen des ersten Enzyms der Synthese, nicht-spezifische Aminolävulinatsynthase (ALAS1), reguliert werden. Es handelt sich hierbei um eine durch Häm-induzierte negative Rückkopplungsschleife, in deren Folge die Transkription, die Translation und die Translokation des Enzyms in die Mitochondrien unterbunden wird. [60, 61] Die in Erythrozyten synthetisierte Isoform, ALAS2 ist in Bezug auf ihre Regulation durch Häm zur ALAS1 nicht vergleichbar. Man beobachtet hingegen eine Erhöhung der Menge an ALAS2 bei erhöhten Hämkonzentrationen [60]. Auch die Hemmung der Translokation in die Mitochondrien wird unterschiedlich diskutiert. [57, 61] Eine denkbare Begründung für die erhöhte ALAS2-Synthese ist in der Regulation des Iron-regulatory proteins 2 (IRP2) zu finden. Das Protein kann an sogenannte Iron-responsive elements (IRE) von RNA-Transkripten binden, die in der 5'-untranslatierten Region liegen, und verhindert dadurch die Translation im Fall der ALAS2. [62, 63] Durch Bindung von Häm an IRP2 wird der Abbau des Proteins induziert, [54] und die RNA kann in eine Proteinsequenz übersetzt werden. [62] Dabei wird IRP2 zunächst oxidiert und anschließend nach Ubiquitinierung proteasomal abgebaut. [54, 63]

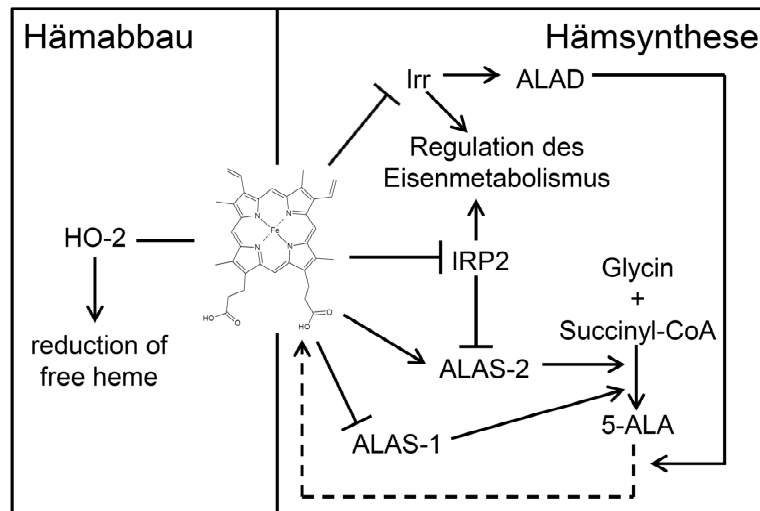


Abb. 8: Häm senkt zellspezifisch seine eigene Verfügbarkeit. In Erythrozyten wird zwar die erythrozytenspezifische ALAS (ALAS2) verstärkt exprimiert, die nicht-spezifische ALAS (ALAS1) wird jedoch in den meisten anderen Geweben wie Leber in ihrer Aktivität gehemmt. Die Hemmung von IRP2 (*H. sapiens*) und Irr (*Bradyrhizobium japonicum*) erfolgt durch die Häm-induzierte Einleitung des proteasomalen Abbaus dieser beiden Proteine und verdeutlicht die funktionelle Konservierung der Regulation durch Häm in verschiedenen Organismen. Durch Bindung von Häm an HO-2, einem Protein des Hämabbaus, wird die Menge an verfügbarem Häm in der Zelle reduziert. (5-ALA, 5-Aminolävulinsäure).

Der Abbau von IRP2 kann aber auch umgekehrte Folgen haben und die Synthese von Proteinen verringern. Ein klassisches Beispiel hierfür ist die Transferrinrezeptor-mRNA, bei der die IREs im 3'-untranslatierten Bereich lokalisiert sind. [62] Durch Bindung von IRP2 kommt es zur Stabilisierung der mRNA und dadurch verstärkt zu deren Translation. Durch Häm-induzierten Abbau von IRP2 verringert sich auch die Transferrinrezeptor-mRNA-Menge und damit die Synthese des kodierten Proteins. [62] Somit ist IRP2 grundsätzlich in die Aufrechterhaltung der Eisenhomöostase involviert. [62] Ein anderes Protein, das vergleichbar zu IRP2 die Homöostase und den Metabolismus von Eisen reguliert, stellt das Iron-response-regulator (Irr)-Protein aus *B. japonicum* dar. Es ist ebenfalls in die Aufrechterhaltung des Eisenhaushalts des Bakteriums involviert und wird durch Bindung von Häm abgebaut. [63, 64] Außerdem kann unter Eisenmangelbedingungen die ALA-Dehydratase (ALAD) in diesem Bakterium gehemmt werden, die essentiell an der Hämbiosynthese beteiligt ist. [65]

Im Rahmen der genannten Häm-bindenden Proteine mit Häm als essentieller Gruppe für die Funktion des Proteins wurden bereits die Hämoxygenasen diskutiert (vgl. Kapitel 2.2.1). Für Hämoxygenase-2 wird darüber hinaus die Bindung von Häm an weitere Motive im Enzym beschrieben, wodurch jedoch keine Änderung in der Aktivität des Proteins entsteht. Man vermutet aber, dass dadurch die Verfügbarkeit an freiem Häm im Pool in der Zelle gesteuert werden kann. In Abhängigkeit vom Redoxstatus des Proteins ist die Bindung von Häm an diese Motive im Enzym variabel (siehe Kapitel 2.4.3.2). [66]

Hämoxygenase-1 ist eines der am stärksten induzierten Akute-Phase-Proteine als Reaktion auf Stress. Es handelt sich dabei um Proteine, deren Expression sich während der akuten Phase einer Entzündung verändert. [67] HO-1 dient zur Neutralisation freigesetzten Häms, das im Rahmen der Wundheilung als prooxidatives und proinflammatorisches Signal wirkt (vgl. Kapitel 2.3.4). [68] Die Hochregulation der Hämoxygenase-1 verläuft in diesem Fall über die Bindung von Häm an Bach1, einen Transkriptionsregulator, der im Komplex mit Proteinen aus der Maf-ähnlichen Onkoprotein-Familie Heterodimere bildet, die die Bindung an Maf-Erkennungs-Elemente (MARE) der regulatorischen Regionen verschiedener Gene ermöglichen. Diese befinden sich unter anderem in den Genen der Hämoxygenase-1, der Globine und der Erythrozyten-spezifischen ALAS2. [63, 69]

Transkription, circadiane Rhythmik und Häm-sensorische Gassensoren

Die Transkription in Hefezellen, photosynthetisch aktiven Bakterien sowie in Säugetieren lässt sich nachweislich durch Häm über verschiedene Proteine wie z. B. HAP1, Bach1, Per2, Rev-erba, Rev-erbβ und PpsR regulieren (Abb. 9). Bereits erwähnt wurde in diesem Zusammenhang Bach1, dessen Affinität zur DNA durch Bindung von Häm reduziert wird, wodurch die Transkription der Gene für β-Globine sowie für HO-1 möglich wird. [69, 70] Gleichzeitig wird der proteasomale Abbau von Bach1 durch Häm induziert. [71] Andere Proteine, bei denen ein vergleichbarer Vorgang beschrieben wurde, sind die bereits erwähnten Irr aus *Bradyrhizobium japonicum* und IRP2 aus *H. sapiens*, aber auch die humanen Arginyltransferase (ATE1) und Period-2 (Per2). [64]

Hinweise darauf, dass die Mengen verfügbaren Häms rhythmisch variieren können, haben zur Untersuchung verschiedener Vertreter im Zusammenhang mit der circadianen Uhr des Menschen geführt (Abb. 9). [72, 73] Per2 als eines dieser Beispiele besitzt im Rahmen der Regulation und Verknüpfung der Hämbiosynthese mit der circadianen Rhythmik eine entscheidende Funktion. Es wirkt als positiver Regulator der Transkriptionsaktivität des Bmal1/NPAS2-Komplexes (Bmal1, Brain and muscle ARNT-like 1), der u. a. die Expression der ALAS1 einleitet. [72] Gleichzeitig hemmt es im Komplex mit den Cryptochrom-Proteinen die Expression von Bmal1 und in einer negativen Rückkopplungsschleife die durch Bmal1/NPAS2-induzierte Per2-Expression. [74] Durch Häm-induzierte Abbauprozesse von Per2 wird die Aktivierung des Bmal1/NPAS2-Komplexes und damit die ALAS1-Expression verringert. [56, 72] Es handelt sich hier scheinbar ebenfalls um eine negative Rückkopplungsschleife, die das zyklisch wiederkehrende Auftreten erhöhter Hämmengen begründen könnte.

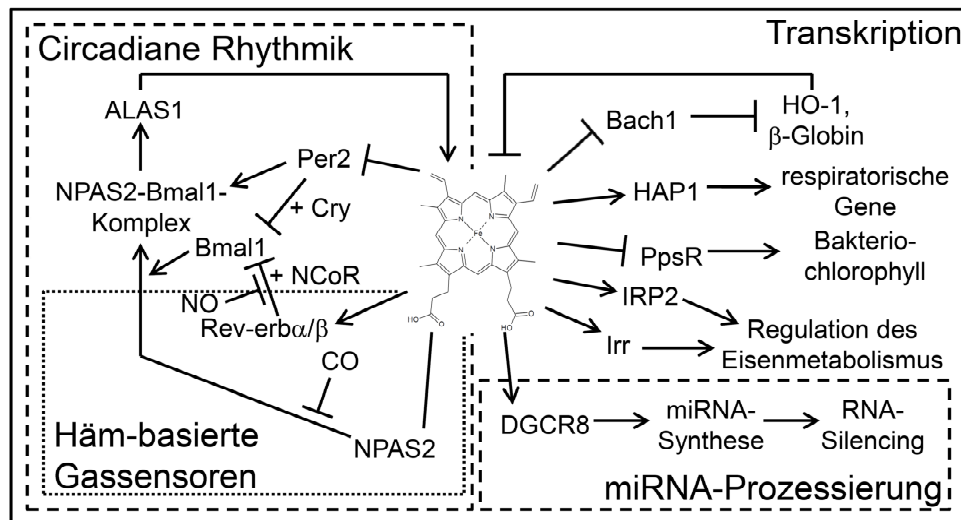


Abb. 9: Einflüsse von Häm auf die Regulation der Transkription sind sehr vielfältig und reichen über Transkriptionsrepression und -aktivierung bis hin zur miRNA-Prozessierung. Es lassen sich Nachweise für Einflüsse von Häm auf die Transkription sowohl in Prokaryoten (z. B. Irr aus *B. japonicum*, PpsR aus *Rhodobacter sphaeroides*) als auch in Eukaryoten (z. B. HAP1 aus *S. cerevisiae*, Bach1 aus *H. sapiens*) finden. Rhythmisch schwankende Hämmengen spiegeln sich in regulatorischen Prozessen von Häm in der circadianen Rhythmik wieder. Dabei spielt primär die Bindung von Häm eine Rolle, durch die gegebenenfalls die Reaktion auf veränderte CO und NO-Konzentrationen erfolgen kann. (Cry, Cryptochrom; DGCR8, DiGeorge syndrome critical region 8).

Man findet aber auch andere humane Proteine, wie Rev-erbα und Rev-erbβ, bei der Aufrechterhaltung der circadianen Rhythmik wieder. Es handelt sich dabei um Häm-bindende nukleäre Hormonrezeptoren, die Häm-induziert den Transkriptionsrepressor NCoR binden und die Genexpression, z. B. von Bmal1 stoppen können. [63, 73] Darüber hinaus ließ sich nachweisen, dass Rev-erbβ nach Hämbindung analog zu den in Kapitel 2.2.1 diskutierten Häm-basierten Gassensoren auf das Vorhandensein von CO und NO reagiert. [63, 75, 76] Damit kommt diesem und anderen Vertretern, wie NPAS2, eine Doppelrolle als sowohl durch Häm als auch durch spezielle Gase regulierte Gassensoren zu. Die Bindung von Häm für die Erkennung von Gasmolekülen ist dafür jedoch Voraussetzung. [25, 59]

Heme activator protein 1 (HAP1) als Transkriptionsaktivator aus *Saccharomyces cerevisiae* ist in einem Chaperon(Hsp70/Hsp90)-gekoppelten Mechanismus für die Aktivierung der Synthese verschiedenerer Proteine im Zusammenhang mit der Zellatmung verantwortlich. Bei einem Überangebot von Häm und/oder Sauerstoff wird HAP1 aktiviert und dadurch verstärkt die Transkription zahlreicher Gene angeschaltet. [55, 71] Erst kürzlich wurde die Regulation des Transkriptionsrepressors PpsR durch Häm in dem photosynthetisch aktiven Purpurbakterium *Rhodobacter sphaeroides* nachgewiesen. Dabei führt die Bindung von Häm u. a. zur erhöhten Synthese von Bakteriochlorophyll. [70]

Translation und miRNA-Prozessierung

Die Translation als nachgeschalteter Prozess kann ebenfalls verschiedentlich durch Häm reguliert werden (Abb. 10). Mögliche Angriffspunkte hierfür befinden sich in der Stabilitätskontrolle der hergestellten mRNA durch miRNA und deren Prozessierung (Abb. 9) sowie durch Regulation der Translationsinitiation (Abb. 10). [38, 77]

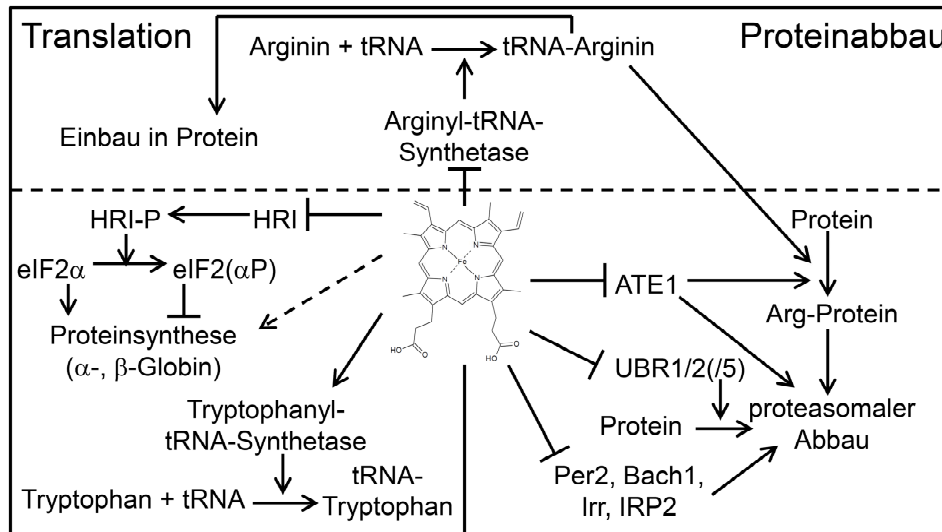


Abb. 10: Translationsprozesse und Vorgänge des proteasomalen Proteinabbaus können auf verschiedenen Ebenen durch Häm moduliert und vernetzt werden. Hemmung der erythrozytenlokalisierten HRI steigert die Synthese von α - und β -Globinen, die bei der Ausprägung ihrer Tertiärstruktur Häm integrieren und sich dann zum Hämoglobin zusammenlagern. Die Arginyl-tRNA-Synthetase verknüpft Prozesse der Translation und des Proteinabbaus miteinander. Durch Anlagerung kann Häm den proteasomalen Abbau von Proteinen wie Bach1, Per2, IRP2 und Irr induzieren. Der Abbauprozess selbst über ATE1, UBR1, UBR2 und die Arginyl-tRNA-Synthetase wird hingegen durch Häm gehemmt. (HRI-P, phosphoryliertes HRI; eIF2(α P) phosphorylierter eIF2 α).

So verursacht die Bindung von Hämin an das sogenannte DiGeorge syndrome critical region 8 (DGCR8)-Protein aus *H. sapiens* (essentieller Bestandteil des Mikroprozessor-Komplexes zur Synthese von miRNA) eine Aktivitätssteigerung des Proteins. Es führt damit zur Bildung von miRNAs, die den Abbau komplementärer Transkripte einleiten können. [38, 78, 79]

Bei der Translationsinitiation spielt der eukaryotische Initiationsfaktor 2 α (eIF2 α) eine entscheidende Rolle. Kommt es zur Phosphorylierung an Ser51 wird dessen Aktivität gesenkt und die Proteinsynthese gehemmt. [77] Dieser Vorgang wird in Erythrozyten beobachtet und ist dabei vorrangig für die Synthese von α - und β -Globinen relevant. Er kann durch die eIF2 α -Kinase erfolgen, die auch als Häm-regulierter Inhibitor (HRI) bezeichnet wird. Im Rahmen der Häm-regulierten Proteine spielt HRI eine essentielle Bedeutung, da seine Aktivität nach Hämbindung gesenkt wird. Dem zugrunde liegt ein nicht mehr stattfindender Phosphorylierungsprozess innerhalb des HRI sowie eine intermolekulare Disulfidbrückenbildung zwischen den Monomeren im HRI-Homodimer, infolgedessen die

Kinase-Funktion des Proteins verloren geht. [77] Es kommt zur Globinsynthese und dadurch zur Bindung überschüssigen Häms im Hämoglobin. [77]

Andere Einflüsse von Häm auf die Translation finden sich in der Übertragung von Aminosäuren, u. a. Arginin und Tryptophan, auf die dazugehörige tRNA. Dieser Vorgang wird durch die Aminoacyl-tRNA-Synthetasen katalysiert. Im Fall der beiden genannten Aminosäuren finden sich verschiedenartige Regulationsmechanismen durch Hämin wieder. Während die Arginyl-tRNA-Synthetase (ArgRS) nach Bindung von Hämin *in vitro* oligomerisiert und dadurch seine Aktivität verliert, wird Tryptophanyl-tRNA-Synthetase durch Interaktion mit Hämin aktiviert. [80, 81]

Zahlreiche Proteine können aber auch durch Häm/Hämin abgebaut werden und damit in ihrer Funktion der Zelle entzogen werden (Abb. 10). Dazu gehören u. a. die bereits erwähnten Proteine Irr, IRP2, Bach1 und Per2. [64] Ein weiterer Vertreter, der nach der "N-Ende-Regel" die Wahrscheinlichkeit des Abbaus verschiedener Proteine erhöht, indem er Arginin an deren N-Terminus anlagert, ist die Arginyltransferase (ATE1). [58] Durch Bindung von Hämin an ATE1 kann sowohl die Aktivität des Enzyms durch Bildung einer intramolekularen Disulfidbrücke gesenkt als auch ihr eigener Abbau initiiert werden. [58] Für die Aktivität der Arginyltransferase wird zunächst Arginin-beladene tRNA benötigt. Deren Synthese wird durch die bereits erwähnte Arginyl-tRNA-Synthetase realisiert, die Häm-sensitiv ist und somit auch beim Proteinabbau eine wichtige Rolle spielt. [80] Außerdem gibt es Befunde, die die Senkung der Aktivität von Ubiquitin-Protein E3-Ligasen (u. a. UBR1, UBR2) durch Bindung von Hämin diskutieren und damit den Einfluss von Hämin auf den Proteinabbau untermauern. [58]

Signaltransduktion, Immunantwort und transmembranaler Ionentransport

Neben den bereits erwähnten regulatorischen Effekten von Häm im Metabolismus sowie der Proteinbiosynthese und dem Proteinabbau sind auch Einflüsse im Immunsystem und bei Entzündungsprozessen bekannt (Abb. 11). [82, 83] In der Aktivierung des Komplementsystems spielt C1q als Erkennungseinheit der ersten Komponente des klassischen Komplementwegs eine entscheidende Rolle. Durch Bindung von Hämin wird die Bindung von IgG (Immunglobulin G) an CRP (C-reactive protein) reduziert, wodurch weitere Erkennungsmechanismen unterbunden werden. [82] In Bezug auf Entzündungsprozesse kann man bei humanen Neutrophilen nach Applikation von Hämin eine Erhöhung der mRNA- und Proteinmengen an Interleukin-8 (IL-8) beobachten. [83] Dieser Effekt wird dadurch begründet, dass es durch Hämin reguliert zu einer gesteigerten Proteinkinase C (PKC)-Aktivierung kommt. [83] Es wird aber auch trotz Inhibition der PKC nach Behandlung von Zellen mit Hämin eine erhöhte IL-8-Expression gefunden, was auf weitere Regulationsmechanismen schließen lässt. [83]

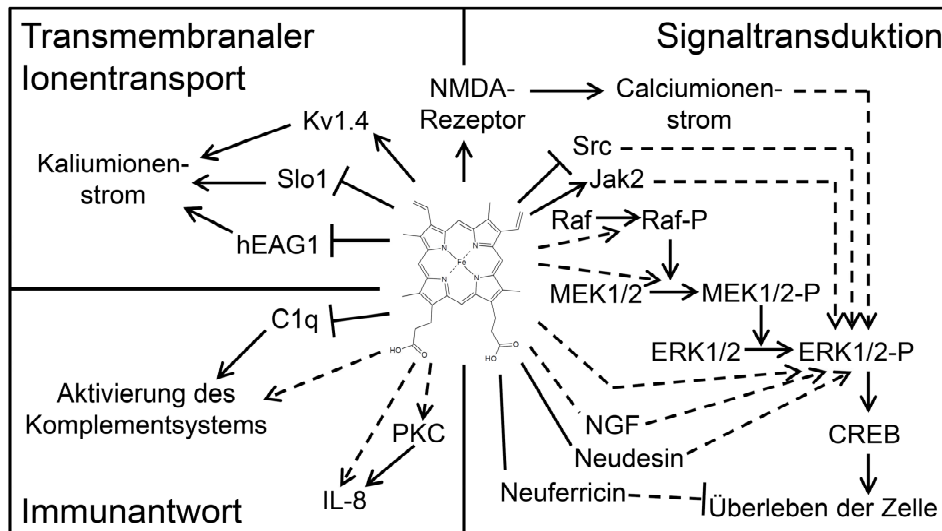


Abb. 11: Einflüsse von Häm auf Signaltransduktion, Immunantwort und transmembranalen Ionentransport. Häm bindet nachweislich direkt an Ionenkanäle, wodurch es, z. B. im Fall des hSlo1-Kanals zu erhöhter Vasokonstriktion im Gehirn kommen kann. [84, 85] Während unmittelbare Interaktionen für solche Ionenkanäle und Rezeptoren mit Häm nachgewiesen werden konnten, sind diverse Änderungen der Signaltransduktion und Immunantwort bisher nur als allgemeine Reaktionen auf die Applikation von Häm oder unter Hämmangelbedingungen auf die Zelle im Gesamten nachgewiesen worden und daher sehr umfangreich. Als erste extrazelluläre, Häm-bindende Proteine sind Neudesin und Neuferricin aufgeführt, die unterschiedlich auf Häm reagieren. [52] Nachweise für Verknüpfungen von PKC und MAPK-Signalweg lassen vermuten, dass hier noch weitere Überschneidungen zustande kommen können. (ERK1/2-P, phosphorylierte extracellular signal-regulated kinase 1/2; Raf-P, phosphoryliertes Raf; MEK1/2-P, phosphorylierte MAPK/ERK Kinase 1/2; NGF, Nervenwachstumsfaktor).

In Bezug auf PKC ist außerdem eine Verknüpfung zum Mitogen-aktivierten-Proteinkinase (MAPK)-Signalweg beschrieben (Abb. 11). [86, 87] Diese Signalweiterleitung bis in den Zellkern erfolgt über verschiedene Proteine (u. a. ERK1/2, MEK1/2, Raf) und kann durch Häm aktiviert werden. [88] Der Einfluss von Häm auf darin involvierte Proteine wird in Kapitel 2.3.5 genauer beleuchtet. Üblicherweise kann die Aktivierung des MAPK-Signalwegs auch durch Bindung von Liganden an Rezeptortyrosinkinasen erfolgen. Untersuchungen in HeLa-Zellen zeigten, dass es ähnlich diskutierte Beispiele (Jak2, Src) gibt, deren Aktivität eindeutig durch Häm reguliert wurde (vgl. Kapitel 2.3.5). [89]

Im Zusammenhang mit zerebralen Vasospasmen sind im letzten Jahrzehnt vermehrt Ionenkanäle in den Blickwinkel der Regulation durch Häm/Hämin gerückt (vgl. Kapitel 2.3.4) (Abb. 11). [53, 84, 85, 90, 91] Eines der am intensivsten untersuchten Beispiele stellt der große Calcium- und spannungsgesteuerte Kaliumionenkanal aus *H. sapiens* (hSlo1) dar. [53, 85, 91] Nach intrazellulärer Bindung von Hämin an den Kanal wurde eine reversible Reduktion des Kaliumioneneinstroms und damit eine Hemmung der Ionenkanalaktivität beobachtet. [53] Untersuchungen an spannungsgesteuerten Kaliumionenkanälen (Kv), insbesondere am Subtyp Kv1.4 aus *Rattus norvegicus* und am humanen Ether-a-go-go-

Kaliumionenkanal 1 (hEAG1) zeigten ebenfalls eine intrazelluläre Interaktion des Kanalproteins mit Hämin. Dabei wurde für Kv1.4 der Verlust der schnellen Inaktivierung und damit eine verlängerte Öffnung der Kanalpore beobachtet. Für hEAG1 wurde ein inhibitorischer Effekt durch Hämin auf die Kanalaktivität beschrieben, der zusätzlich zu verändertem Schaltverhalten des Proteins führte. [90]

2.3 Pathophysiologische Folgen von Häm-assoziierten Fehlregulationen

Das breite Vorkommen und seine Funktionen machen Häm zu einem zentralen Anker verschiedener lebensnotwendiger Prozesse. Kommt es zu Fehlregulationen oder Störungen im typischen Ablauf der Häm-assoziierten Prozesse kann dies schwerwiegende Folgen nach sich ziehen, die in den folgenden Abschnitten näher beschrieben werden.

2.3.1 Porphyrien und Anämien

Häm tritt in verschiedenen Enzymen des Menschen mit unterschiedlichen, zum Teil essentiellen Funktionen auf (vgl. Kapitel 2.2). Eine vollkommene Auslöschung der Hämsynthese ist daher letal. Es sind jedoch zahlreiche Hämmangelerkrankungen bekannt, in denen die Synthese des Biomoleküls reduziert ist. Unter anderem kommt es dabei zur Ausbildung von Anämien und Porphyrien. [60, 69]

Anämien können bei Eisenmangel, fehlerhafter Globinsynthese oder Dysfunktionen der erythrozytenspezifischen ALAS (ALAS2) entstehen und reduzieren damit die Hämoglobinsynthese maßgeblich. [77] Üblicherweise kommt es dadurch zur Änderung des Phänotyps der Erythrozyten, unter denen die Sichelzellanämie als Defekt der β -Globinsynthese die bekannteste Form darstellt. [23] Unmittelbar mit der Hämbiosynthese verknüpft ist hingegen die sideroblastische Anämie, bei der die ALAS2 unzureichend funktionsfähig ist. [60, 69] Das Enzym katalysiert den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Verknüpfung von Glycin und Succinyl-CoA zur 5-Aminolävulinsäure (5-ALA) (Abb. 8). Findet dieser Prozess in ungenügendem Ausmaß statt, kommt es zu erhöhten Eisenwerten, die toxisch für den Organismus sind. Zu den klassischen Symptomen gehören Blässe, Kurzatmigkeit, Erschöpfung und allgemeine Schwäche. [60]

Die Herstellung von Häm im menschlichen Organismus ist jedoch ein 8-stufiger Prozess, sodass auch Probleme hinsichtlich reduzierter Hämsyntheseraten zu diskutieren sind, die durch die verbleibenden sieben Enzyme verursacht werden. Durch Defekte und dadurch reduzierte Umsetzungsraten dieser Enzyme kommt es zur Anhäufung von Hämvorstufen (Porphyrin und andere), die damit namensgebend für das Krankheitsbild der Porphyrien sind. [69] Typische Symptome sind Lichtempfindlichkeit und neurologische Störungen. Die

Ansammlung von Hämvorstufen kann außerdem zu roten Zähnen und Hautverletzungen nach Kontakt mit Sonnenlicht führen, da die meisten Porphyrinvorstufen lichtsensitiv sind und daraufhin die Bildung von ROS katalysieren können. Darüber hinaus kann es zu akuten Attacken kommen, für die schwerwiegende Unterleibsschmerzen, Übelkeit, Verstopfungen, Bluthochdruck, Herzrasen und Funktionsstörungen der Blase charakteristisch sind. [60, 69] Auch mentale Probleme wie Depressionen, Angstzustände und Schlafstörungen bis hin zu Halluzinationen und Paranoia sind in Abhängigkeit der jeweiligen Porphyrinen bekannt. [60, 69]

Porphyrien können sowohl erworben als auch genetisch vererbt werden. Man unterscheidet sie in hepatische und erythropoietische Porphyrien, wobei letztere sich ausschließlich durch Lichtempfindlichkeit auszeichnen. Dagegen ist im Falle der genannten Porphyrien zusätzlich mit akuten Attacken und neurodegenerative Schäden, wie sie im nächsten Kapitel z. B. für die Alzheimer-Krankheit diskutiert werden, zu rechnen. [60]

2.3.2 Neurodegenerative Erkrankungen

Alzheimer, Parkinson und (altersbedingte) Demenz stellen nur einen Ausschnitt bekannter neurodegenerativer Krankheiten dar. Im Zusammenhang mit Häm- und Hämabbauprodukten sind vermehrt Forschungen zur Kausalität zwischen veränderten Hämmengen und dem Auftreten dieser Krankheiten untersucht worden. Auffällig ist dabei im Allgemeinen, dass sich in den meisten Fällen erhöhte Mengen an Hämoxygenase-1 (HO-1) in den betroffenen Zellen wiederfinden. [52] Der durch Hämoxygenasen katalysierte Abbau von Häm (Abb. 5) führt letztlich zur Bildung von Bilirubin, das antioxidative Eigenschaften aufweist, und CO, das als Neurotransmitter eine wichtige Stellung als Resultat des Hämabbaus einnimmt. Diesen positiven Effekten steht jedoch die Freisetzung von Fe^{2+} gegenüber, das in zu großen Mengen toxisch wirkt. Daher ist ein ausbalanciertes System in Bezug auf den Hämabbau essentiell. [52]

Diese Notwendigkeit erkennt man in klassischen neurodegenerativen Erkrankungen wie Alzheimer oder Parkinson wieder. Bei der Alzheimer-Krankheit kann man unter gesteigerten Konzentrationen an Hämoxygenase-1 eine Verringerung der Aktivität der Expression des Tau-Proteins sowie eine verringerte Aktivierung des MAPK-Signalwegs beobachten. [52]

Im Jahr 2004 wurde erstmalig *in vitro* der direkte Nachweis erbracht, dass Häm durch Interaktion mit dem humanen Amyloid- β -Protein ($\text{A}\beta$) an der Ausbildung der neurodegenerativen Alzheimer-Krankheit beteiligt sein könnte. [92] Es konnte gezeigt werden, dass ein Komplex geformt wird, der daraufhin Peroxidase-Aktivität besitzt. Aktuelle Modelle postulieren, dass durch gesteigerte Peroxidase-Aktivität erhöhter oxidativer Stress in Alzheimer-erkrankten Zellen zustande kommt, der charakteristisch für das Krankheitsbild

ist. [93] Durch diese Interaktion wird zunächst die Bildung der zytotoxischen Aggregate des A β -Proteins inhibiert. [93, 94] Gleichzeitig wird aber auch eine Reduktion der ALAS1 sowie der Porphobilinogen-Deaminase (PBGD) und damit der Hämbiosynthese im Rahmen der Alzheimer-Krankheit beobachtet. Es wird vermutet, dass dadurch ein Mangel an Häm entsteht, woraufhin es erneut zur Bildung der charakteristischen Plaques auf der Oberfläche der Zellen kommt (Abb. 12). [52, 93]

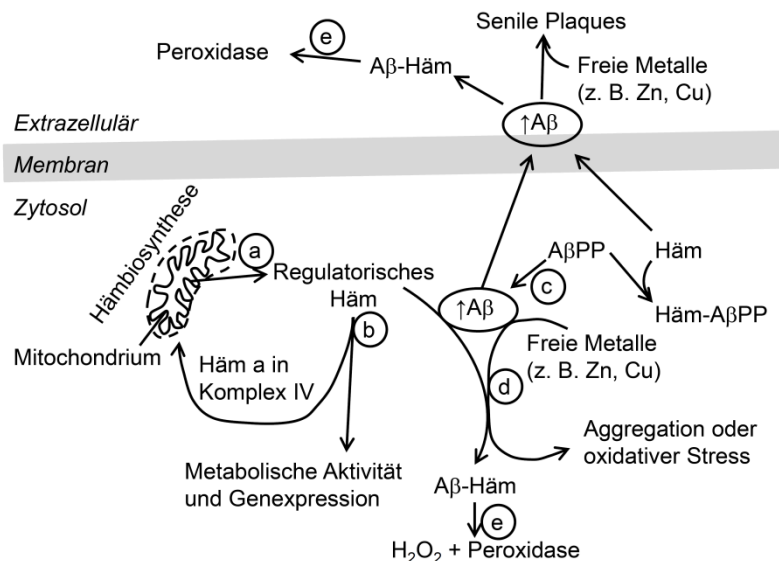


Abb. 12: Häm im Zusammenhang mit der Alzheimer-Krankheit. In Häm wird nach der Synthese aus den Mitochondrien ins Zytosol exportiert (a), wo es in diversen metabolischen Aktivitäten eine wichtige Rolle spielt (b). Im Gehirn von Patienten mit der Alzheimer-Krankheit wird vermehrt A β aus den A β PP gebildet (c). Häm verhindert die Aggregation des A β (d), indem es einen Komplex mit dem A β bildet, der Peroxidase-Aktivität besitzt (e). Gesteigerte A β -Bildung kann folglich zur Hämdefizienz führen, die durch die Komplexbildung zum typischen gesteigerten oxidativen Stress der Alzheimer-erkrankten Zellen beiträgt. (A β PP, Amyloid- β -Vorläuferprotein). Modifiziert nach [93].

Vergleichbar zur Alzheimer-Krankheit findet man bei der Parkinson-Krankheit ebenfalls erhöhte Konzentrationen von HO-1, die mit typischen Strukturen, den sogenannten Lewy-Körpern, in den Zellen betroffener dopaminergischer Neuronen koloalisiert vorliegen. Dieser Zusammenhang stellt auch zugleich einen potentiellen therapeutischen Ansatz dar, da die vermehrte Expression von HO-1 sowohl antiinflammatorisch als auch neuroprotektiv wirkt, indem es die Redoxhomöostase der Zellen wiederherstellt. [52]

Sowohl bei Demenz als auch bei anderen neurodegenerativen Erkrankungen kann man beobachten, dass die Behandlung von kortikalen Neuronen mit extrazellulärem Hämin einen Rettungseffekt in den Zellen auslöst, der einen Abbau der Neuriten sowie ein Absterben der betroffenen Zellen verhindert. Es kommt zur Auslösung von einem das Überleben fördernden

Signal durch die Wiederherstellung und Aufrechterhaltung der ERK1/2-Aktivität unter Hämineinfluss (Abb. 11). [52, 95] Kortikale Nervenzellen, die ohne Häm wachsen, zeichnen sich hingegen durch eine deutlich verringerte Neuritenbildung aus. [52] In diesem Zusammenhang wurde beobachtet, dass die ERK1/2-Aktivität abhängig von der Aktivierung der membranlokalisierten NMDA-Rezeptoren war. Unter Hämmangelbedingungen wurde ein verringerter Ca^{2+} -Einstrom in die Zelle beobachtet, der dadurch zu verminderter ERK1/2-Aktivität führte. [52, 95] Gleichzeitig konnte man auch eine geringere Expression, Phosphorylierung und Funktionalität der NMDA-Rezeptoren beobachten, die im Allgemeinen relevant für Lern- und Gedächtnisprozesse sowie die Erzeugung der synaptischen Plastizität sind. [52, 95, 96]

2.3.3 Alter

Mit zunehmendem Alter kann eine Abnahme der Hämsynthese beobachtet werden. [52] Der daraus resultierende Hämmangel kann sich verschiedentlich bemerkbar machen. Neben den bereits in Kapitel 2.3.2 diskutierten neurodegenerativen Prozessen wird eine Abnahme an Komplex IV der Atmungskette in den Mitochondrien beobachtet. [69, 97] Ein solcher Vorgang geht einher mit erhöhtem oxidativen Stress und Problemen in der Ca^{2+} -Homöostase. [52]

Parallel dazu erhöht sich bei den meisten Menschen mit steigendem Alter der Anteil eingenommener Medikamente. Um diese effektiv umsetzen zu können sind die Häm-tragenden Cytochrom-P450-Proteine notwendig. Ihre Neusynthese ist zumeist unumgänglich, um mit den steigenden Mengen an verabreichten Pharmaka umgehen zu können. Jedoch ist die dafür essentielle Hämsynthese im steigenden Alter reduziert, was mit einer gesenkten ALAS1- und einer erhöhten HO-Syntheserate einhergeht. Der Mangel an Häm führt somit zu einer begrenzten Cytochrom-P450-Verfügbarkeit. Darüber hinaus ist für den Subtyp Cytochrom P450 1A1 bekannt, dass erst das Vorhandensein von Häm die Überführung des Proteins vom Zytosol in das Endoplasmatische Retikulum (ER) ermöglicht, wo es seine biologisch aktive Form annimmt. Dieser Effekt in Häm-defizienten Zellen kann durch Behandlung mit Häm aufgehoben werden. [52]

Es wird damit klar, dass Häm einen entscheidenden Risikofaktor darstellt, der den Alterungsprozess von Zellen signifikant beeinflussen kann.

2.3.4 Hämolyse und zerebraler Vasospasmus/Subarachnoidalblutungen

Im Gegensatz zu den in Kapitel 2.3.1 angesprochenen Hämmangelerkrankungen kann es auch zu Störungen bei zu hoher Ausschüttung von Häm kommen. Eine solche unkontrollierte Freisetzung des Moleküls in Mengen über dem physiologischen Niveau durch die

Schädigung von Zellen und Geweben kann vielfältige Ursachen haben. Charakteristisch ist dieser Vorgang vor allem für hämolytische Anämien, Sichelzellanämien und Malaria, sowie für Traumata und Blutungen (Abb. 13). [83, 98]

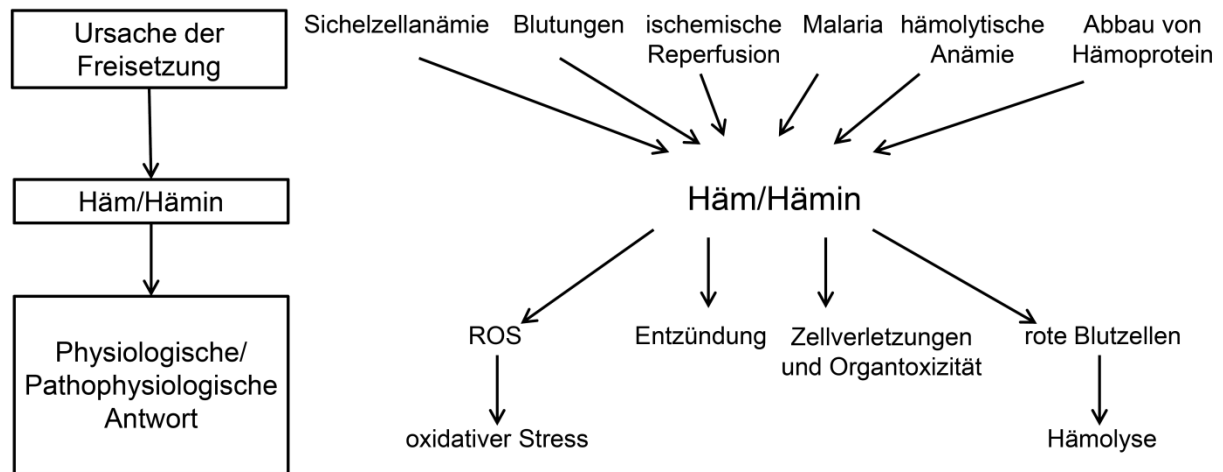


Abb. 13: Verschiedene Prozesse können die erhöhte Freisetzung von Häm und dessen toxische Effekte induzieren. Dazu gehören Reaktionen des Immunsystems (Entzündungsreaktionen, ROS-Freisetzung) sowie die vorzeitige und verstärkte Hämolyse von Erythrozyten bis hin zu Vorgängen, die zum vollständigen Organversagen führen können. Modifiziert nach [98].

Erhöhte Mengen "freien" Häms werden daraufhin vom Organismus als Gefahrensignal interpretiert und führen zur Stimulierung proinflammatorischer Signale, um das Immunsystem einzuschalten. Um dieses Signal wieder abzuschalten, ist der Abbau von Häm eine essentielle Komponente (siehe auch Abb. 5). [68]

Die Hämolyse (Auflösung von Erythrozyten), als einer der Häm-freisetzenden Prozesse, führt unter kontrollierten Bedingungen zum Abbau von Erythrozyten in Leber und Milz, wenn diese ein Alter von ca. 120 Tagen erreicht haben. [99] Tritt dieser Prozess vorzeitig ein, muss das aus Hämoglobin freigesetzte, überschüssige, zytotoxische Häm effektiv gebunden und abgebaut werden. [51, 60] Kommt es dabei zu Problemen durch Defekte im Hämabbauweg, kann das zur Hyperbilirubinämie führen, die unter anderem Leberfunktionsstörungen und Gelbsucht zur Folge hat. Eine klassische Form einer solchen Fehlfunktion stellt die neonatale Gelbsucht dar. Sie beruht häufig auf der noch nicht ausreichend ausgeprägten Aktivität der UDP-Glucuronosyltransferase. Zur Behandlung werden die Neugeborenen mit blauem Licht bestrahlt, um eine Umsetzung des überschüssigen Bilirubins in nicht-toxische Produkte zu erreichen. [60] Die Konsequenzen unbehandelter, wiederholt auftretender vorzeitiger Hämolyse sind weitreichend und können von Arteriosklerose bis hin zum Nierenversagen führen. [69, 83]

Aus Verletzungen resultierende Blutungen können in den entstehenden Hämatomen zu Häm-/Häminkonzentrationen von $> 350 \mu\text{M}$ führen. [52] Unter Bildung von ROS wird es zum

Methämoglobin oxidiert und Hämin freigesetzt (vgl. Kapitel 2.2.2). [52] Üblicherweise wird die Menge freien Häms durch Einsatz von HO-Systemen sowie anderer effizienter Häm-bindender Proteine wie Hemopexin und Albumin reduziert. [52] Dennoch kann es bei zu hohen Hämkonzentrationen oder unzureichender Hämentsorgung zur Ausprägung negativer Folgen für den Organismus kommen. [52] Die durch Häm/Hämin verursachten Veränderungen beruhen dabei sowohl auf extra- als auch intrazellulären Prozessen, wie sie in Kapitel 2.2.2 angesprochen wurden. Voraussetzung für letztere ist die Aufnahme von Häm in die Zellen, das als lipophiles Molekül nachweislich innerhalb von 30 Minuten leicht die Membran passieren kann. [100] Während Ebert *et al.* die Aufnahme über passive Diffusion diskutieren [100], deuten neuere Nachweise auf Transporter-vermittelten Hämtransfer über die Membran hin. [101, 102] Anschließend kann das in die Zelle importierte Häm proinflammatorisch wirksam werden (Abb. 14) und Entzündungsprozesse zum Beispiel durch die Aktivierung von IL-8 über PKC auslösen (siehe Abb. 11). [83] Gleichzeitig hat es aber auch andere Effekte zur Folge, wie die Auslösung der Vasokonstriktion und die Aktivierung des Komplementsystems, was jedoch im Widerspruch zu aktuellen Befunden bezüglich der Hemmung der Initiation des Komplementsystems über C1q durch Hämin steht. [68, 82] Die Bildung von ROS durch Häm wird ebenfalls als proinflammatorisches Signal verstanden, über das die Transkriptionsfaktoren NF- κ B, AP-1 und SP-1 aktiviert werden können. [69, 98] Unabhängig von den beschriebenen Prozessen, die in Neutrophilen stattfinden, wird für endotheliale Zellen die Expression von Adhäsionsproteinen und Selektinen beschrieben, die die Rekrutierung von Leukozyten gewährleisten. [98] Durch das Zusammenspiel dieser und anderer Faktoren wird es ermöglicht, eine adäquate Antwort des Immunsystems auf Verletzungen (inkl. Freisetzung von Häm) zu gewährleisten.

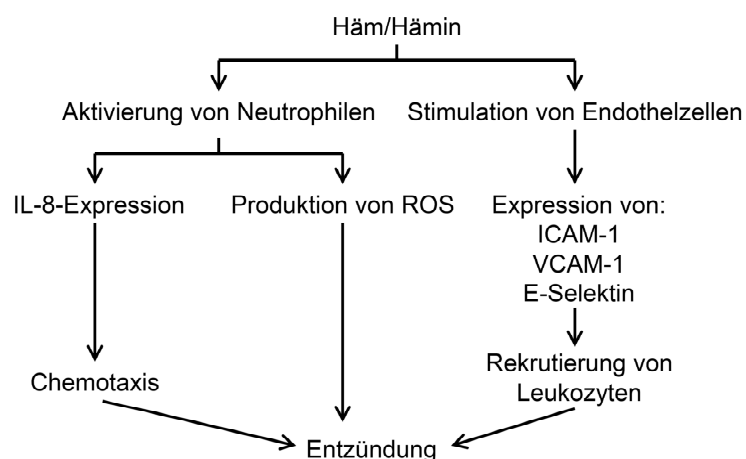


Abb. 14: Proinflammatorische Effekte von freiem Häm/Hämin. (ICAM-1, intrazelluläres Adhäsionsmolekül/-protein 1; VCAM-1, vaskuläres Zelladhäsionsmolekül/-protein 1; E-Selektin, endotheliales Leukozytenadhäsionsmolekül). Modifiziert nach [98].

Hämorrhagische Infarkte, intrazerebrale Blutungen und Subarachnoidalblutungen (SAB) gehen mit erhöhten Mengen an freiem Häm einher und sind häufig tödlich. [52] Typische Symptome von SAB sind pathologische Vasokonstriktionen oder zerebraler Vasospasmus (krampfartige Verengung von Blutgefäßen des Gehirns). [84, 103] Nach Eintreten einer Blutung im zentralen Nervensystem wird Hämoglobin innerhalb einiger Stunden aus den Erythrozyten freigesetzt. [52] Neben der Bildung von zytotoxischen ROS durch Häm und von Hämabbauprodukten wie Eisen, die bei Ansammlung im Gehirn zu Gehirnschwund führen können [52], werden aber auch Mechanismen beschrieben, in denen eine alternative Hämabbauroute eingeschlagen wird. [103] Diese führt zu den sogenannten Bilirubinoxidationsprodukten A und B (BOX A, BOX B) und 4-Methyl-3-vinylmaleimid (MVM), die ursächlich mit an den vasokonstriktiven Prozessen bei zerebralen Vasospasmen beteiligt sein sollen. [103] Gleichzeitig werden aber auch Prozesse beschrieben, in denen Häm direkt einen Einfluss auf Ionenkanalproteine wie hSlo1 hat (Abb. 11). Dieser ist u. a. in zerebralem Gewebe lokalisiert und kann durch Hämin nach Überwinden der Zellmembran in seiner Aktivität moduliert werden. [53, 85] Eine solche Regulation wird als einer der Schritte zur Einleitung der Blutgefäßkontraktion und damit der Vasospasmen nach einer SAB diskutiert, die bis hin zum Infarkt führen können. [84, 85]

2.3.5 Krebs

Wachstum und Apoptose sind Prozesse, die maßgeblich über das Schicksal einer Zelle entscheiden. Während das Wachstum festgeschriebenen Programmen im Rahmen des Zellzyklus folgt, sind apoptotische Mechanismen durch Proteine reguliert, die vom Zellzyklusarrest bis hin zur spezifischen Differenzierung und/oder zum Abbau einer Zelle verschieden reguliert werden können. [69] Der Einfluss von Häm ist dabei zelltypspezifisch. [69] Während PC12 Neuronen und K562 erythroide Zellen durch Häm zur Differenzierung gebracht werden, beobachtet man bei HeLa-Zellen ein gesteigertes Zellwachstum und erhöhte Zellzyklusaktivität. [69] Verschiedene Proteine sind für diese Vorgänge verantwortlich, wobei vor allem p18, p21 und p53 als negative Regulatoren des Zellzyklus sowie die Proteine Cdk1 (Cyclin dependent kinase 1) und Cdk4 (Cyclin dependent kinase 4) als positive Regulatoren im Zusammenhang mit Häm bisher genauer untersucht wurden. Man beobachtet durch Häm eingeleitete Differenzierungsprozesse in K562 Zellen über Induktion von p18 und p21, während die Cyclin D2-Expression gesenkt wird (Abb. 15). [69, 88] Umgekehrt findet man aber auch eine gesteigerte Induktion von p21 und p53 in HeLa-Zellen unter Hämmangelbedingungen, während Cdk1 und Cdk4 inhibiert werden, wodurch die Zelle in den Zellzyklusarrest bis hin zur Apoptose gebracht werden kann. [69, 88]

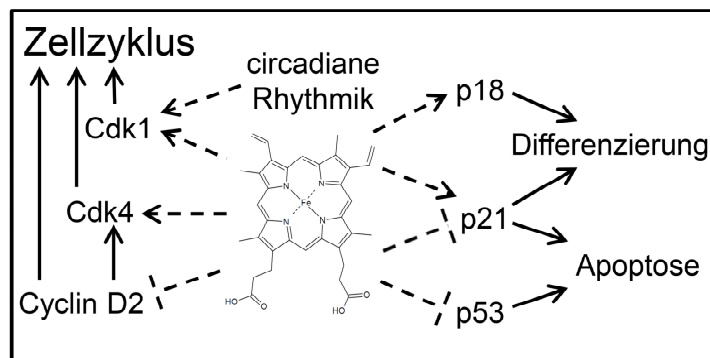


Abb. 15: Einflüsse von Häm auf den Zellzyklus in HeLa-Zellen sind zelltypspezifisch. Während in erythroiden K562-Zellen eine Differenzierung durch Häm eingeleitet wird und dadurch p21 verstärkt exprimiert wird, findet sich ein inhibierender Effekt in HeLa-Zellen und damit eine Hemmung der Apoptose. [69] Im Vergleich zeigt sich außerdem eine Hemmung der Cyclin D2-Expression in erythroiden Zellen, die im Komplex mit Cdk4 den Zellzyklus vorantreiben würden. [88] In HeLa-Zellen findet man hingegen eine erhöhte Expression der Cdk4. Eindeutige, direkte Interaktionen sind in bisherigen Quellen nicht genauer hinterlegt und lassen daher Vermutungen auf Hämregulationsmechanismen an vorgelagerten Proteinen zu. Eine Möglichkeit dafür stellen Proteine aus der circadianen Rhythmik dar, für die bereits eine unmittelbare Regulation durch Häm nachgewiesen werden konnte (vgl. Kapitel 2.2.2). Zusammenhänge für Interaktionen von beispielsweise Cdk1 mit der circadianen Rhythmik wurden bereits bestätigt. [104]

Weiterführende Untersuchungen an HeLa-Zellen konnten Einflüsse von Häm auf die Phosphorylierungsaktivitäten verschiedener Proteine des MAPK-Signalwegs identifizieren (siehe auch Abb. 11). So ist eine durch Häm gesteigerte Phosphorylierung und Aktivierung von Raf, MEK1/2 und ERK1/2 bekannt. [88] Gleichzeitig kann Häm aber auch die Phosphorylierungsaktivität von Rezeptortyrosinkinasen (RTK), die diesen Signalweg ansteuern, regulieren. [89] Bisher untersuchte Vertreter sind Janus kinase 2 (Jak2) und Src (siehe auch Kapitel 2.2.2), die jedoch unterschiedlich auf Häm reagieren. Während Jak2 an Tyrosin 1007/1008 phosphoryliert und dadurch aktiviert wird, führt die Phosphorylierung von Tyrosin 530 in Src zu einer Inhibition der RTK. Vor allem Src als bekanntes Onkogen ist hierbei ein vielversprechendes Zielprotein der Tumorthherapie. [89, 105]

Daraus abgeleitet postulierten Ye *et al.* auf der Basis ihrer Ergebnisse die Hemmung der Synthese von Häm in Tumorzellen als effektiven Ansatzpunkt zur Blockierung der Zellproliferation und darüber hinaus zur Einleitung der Seneszenz und Apoptose erkrankten Gewebes. [88] Eine andere Möglichkeit diskutieren Yao *et al.*, die veränderte Hämkonzentrationen im Allgemeinen berücksichtigen und auch den Einsatz von Hämanaloga in Betracht ziehen, um so eventuell veränderte Interaktionen mit weiteren RTKs zu ermöglichen. [89]

2.4 Charakterisierung der Hämbindung an Proteine

Die Bindung von Häm/Hämin an Proteine ist keineswegs zufällig. Dabei sollte man zunächst kovalent- und nicht-kovalent-verknüpfte Häm-Protein-Komplexe betrachten. Während zu ersteren Cytochrom c und Säugetierperoxidasen wie die Lactoperoxidase oder die Myeloperoxidase gehören, die Thioetherbindungen oder Veresterungen zum Häm aufweisen (vgl. Kapitel 2.2.1), zeichnen sich letztere durch eine reversible Hämbindung aus.

Unter Berücksichtigung der Einbindung von Häm in die Struktur empfiehlt sich eine Einteilung in permanent und transient Häm-bindende Proteine. Charakteristisch für permanent Häm-bindende Protein ist eine durch Häm/Hämin induzierte Faltung. Transiente Hämbindungen zeichnen sich hingegen nicht primär durch Einflüsse auf die Faltung aus, sondern verursachen vorrangig eine Veränderung der relativen Orientierung existenter struktureller Einheiten zueinander. [5, 106] Häm selbst ist bekannt für die Induktion der Faltung von α -Helices, und es gibt zahlreiche Beispiele, in denen Häm Interaktionen über einen axialen, in eine α -Helix involvierten Liganden nachgewiesen werden. [5, 107, 108] Dennoch sind auch andere strukturelle Modelle bekannt, in denen Häm auf diese Art und Weise z. B. mit β -Faltblättern oder Schleifen-Regionen interagiert. [109, 110] Daher ist gut nachvollziehbar, dass es mehr als 20 verschiedene allgemeine Strukturen für Proteine gibt, die Häm b binden können, [111] während der Umfang hinzukommender, neuartiger Strukturtopologien durch weitere Entdeckungen stetig wächst (vgl. z. B. Rev-erb β , [75]). Dieser Aspekt legt nahe, dass nicht ausschließlich die Oberflächentopologie eines Proteins, im Speziellen das Vorhandensein einer Hämbindetasche, die Bindung von Häm und damit die Beeinflussung der Funktion des Proteins bestimmt. Faktoren, die bereits auf der Ebene der Primärstruktur eine Rolle spielen, müssen dafür berücksichtigt werden.

Die Bindung von Häm kann zunächst über die axialen Liganden charakterisiert werden. Penta- und Hexakoordination des Häms, unabhängig vom Oxidationszustand des Fe-Ions, durch Sauerstoff-, Stickstoff- oder Schwefelatome ist in Proteinen die Regel. Dabei treten vor allem die Aminosäuren Histidin, Methionin, Tyrosin, Cystein und Lysin auf, während in Ausnahmen (u. a. im Fall des CooA) auch Prolin gefunden wird. [5, 26, 112] Nach dem HSAB-Prinzip (Hard-Soft Acid-Base) sind dabei Histidin und Methionin als Liganden bevorzugt bei der Koordination von Häm zu finden, während Cystein und Tyrosin vorrangig bei der Stabilisierung von Hämin auftreten. [5] Der Koordination des Häms durch die axialen Liganden wird ein erheblicher Anteil in der Stabilisierung der Bindung an das Protein zugeschrieben. [5, 113] Dennoch ist der Austausch dieser Aminosäuren gegen andere axial koordinierende Aminosäuren mit fatalen Folgen für die Funktion des Proteins verbunden, die von Änderungen der ursprünglichen Funktion bis hin zu vollkommenem Funktionsverlust reichen können. [5, 114] Untersuchungen, in denen ein Austausch zu einer nicht-

koordinierenden Aminosäure durchgeführt wurde, zeigen, dass Häm trotzdem an die Proteine binden kann und deuten damit darauf hin, dass neben der/den axial koordinierenden Aminosäure/n weitere Interaktionen mit Häm stattfinden müssen. [75, 115, 116] Es kristallisieren sich dabei zunächst hydrophobe Wechselwirkungen der Methyl- und Vinylgruppen sowie des Tetrapyrrolysystems mit den aliphatischen Aminosäuren Leucin, Isoleucin und Valin heraus. [111, 112] Gleichzeitig sind für Phenylalanin, Tyrosin und Tryptophan aromatische π -Stacking-Effekte zum aromatischen Porphyringerüst [111, 112] und van-der-Waals-Kontakte zwischen Phenylalanin, Leucin, Valin und Alanin zum Rand des Häms zu beobachten. [111] Auffällig sind ebenfalls elektrostatische Wechselwirkungen von hauptsächlich Arginin aber auch Lysin, Histidin und Tyrosin mit den Propionatseitenketten des Häms, die zur Verankerung des Häms im Protein dienen. [106, 111, 112]

Neben den genannten Interaktionen des Proteins mit dem Porphyringerüst sind zusätzlich stabilisierende Effekte innerhalb des Proteins von essentieller Bedeutung für die Hämbindung. Dazu gehören zunächst Wechselwirkungen, die eine möglichst dichte Packung des axialen Liganden zur Stabilisierung seiner Orientierung zum Häm generieren sollen. Solche Wechselwirkungen finden sich insbesondere in Form von π -Stacking-Wechselwirkungen von aromatischen Aminosäuren mit aromatischen axialen Liganden des Häms wieder (Abb. 16). Es gibt aber auch dichte Packungen bei nicht-aromatischen axialen Liganden (Abb. 16). [111] Außerdem spielen auch Wasserstoffbrückenbindungen, z. B. zwischen Tryptophan und dem axialem Cystein, eine wichtige Rolle zur Unterstützung der Verankerung des Häms im Molekül (Abb. 16). [117]

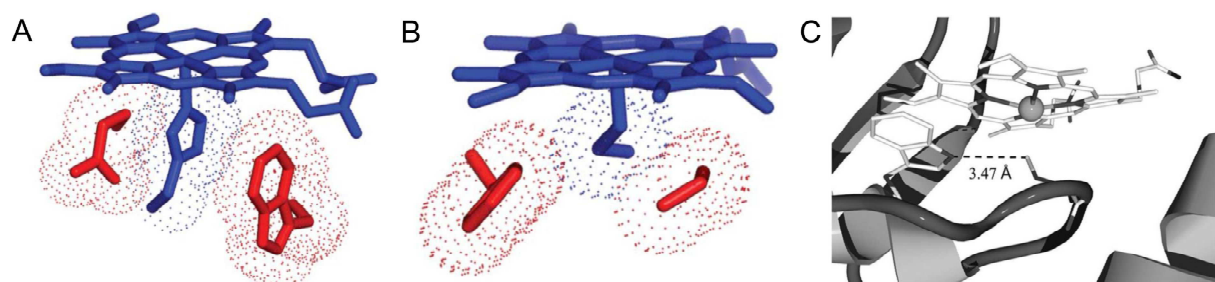


Abb. 16: Bindung des axialen Liganden an Häm ist durch Wechselwirkungen weiterer Aminosäuren des Proteins beeinflussbar. Generierung von dichten Packungen des axialen Liganden durch Aminosäuren in zum Teil naher Nachbarschaft führt zu stabileren Interaktionen mit Häm (A, B). [111] In Hemopexin wird Histidin (His265) durch π -Stacking-Effekte mit Tryptophan (Trp267) aber auch durch Einflüsse eines Glutaminsäurerests (Glu225) ausgerichtet (A). [111] In Cytochrom P450 2C8 findet man die dichte Packung eines axialen Cystein-Liganden (Cys435) mit Glycin- (Gly437) und Phenylalaninseitenketten (Phe428) (B). [111] Zusätzlich haben Wasserstoffbrückenbindungen von Aminosäuren des Proteins zum axialen Liganden einen stabilisierenden Effekt, dargestellt für die NO-Synthase aus *Bacillus subtilis* bei der Wechselwirkung zwischen einem Tryptophan (Trp66) und dem axialen Cystein (Cys72) (C). [117]

2.4.1 Häm-bindende versus Häm-regulatorische Motive

Lathrop und Timko definierten 1993 erstmals den Begriff des "Häm-regulatorischen Motivs" (HRM), der namensgebend für eine wachsende Gruppe an Proteinen wurde, die einen kurzen Sequenzabschnitt aus fünf Aminosäuren zur Hämbindung enthielten. [57] Der wichtigste Bestandteil war dabei die unmittelbare Aufeinanderfolge von Cystein und Prolin, die inzwischen den Begriff "CP-Motiv" in den Häm-regulierten Proteinen trägt. [59] Bei den regulatorischen Motiven für die Hämerkennung handelt es sich um oberflächenlokalisierte Sequenzen, die durch Bindung von Häm eine reversible Änderung in der Aktivität oder eine verringerte Stabilität des Proteins erfahren. [59] Es seien weiterhin Proteine erwähnt, die durch veränderte Bedingungen einen Thiol/Disulfid-Redox-Wechsel durchlaufen können und damit ein verändertes Bindungsverhalten zu Häm aufweisen. [59] Neben den genannten CP-Motiven ist abschließend im Rahmen der durch Häm-regulierten Sequenzen das CXXCH-Motiv zu nennen, das in diesem Zusammenhang bisher ausschließlich für hSlo1 bekannt ist. [53]

Im Gegensatz dazu stehen die "Häm-bindenden Motive" (HBM), die u. a. für die Realisierung der Bindung von Häm in Hämbindetaschen oder in kovalent verknüpften Interaktionen verantwortlich sind. Die Einflüsse charakteristischer Aminosäuren spannen bei dieser Klasse an Motiven meist über einen weiten Bereich des Proteins. [19, 35] Charakteristische Sequenzmotive liefern hierbei die breite Klasse der Cytochrom-P450-Proteine, die Peroxidasen und die Cytochrom c-Motive, deren Sequenzspezifitäten verschiedentlich umfangreich diskutiert wurden. [39, 40, 112, 118] Darüber hinaus unterscheiden sich die bekannten HBMs gegenwärtig von den HRMs durch die Verfügbarkeit von Strukturinformation. Nur in wenigen Fällen existiert eine aufgelöste Struktur der Häm-regulierten Proteine sowohl mit als auch ohne Häm, während die Häm-bindenden Proteine sehr breit in diesem Zusammenhang untersucht sind. [5, 119]

Eine detailliertere Analyse bekannter Sequenzmotive soll das nachfolgende Kapitel liefern.

2.4.2 Charakteristische Merkmale Häm-bindender Motive

2.4.2.1 Cytochrom-P450-Proteine

Ein sehr breites Spektrum von Cytochrom-P450-Proteinen mit der Funktion der Oxidation diverser Substrate ist bekannt. Durch die hohe Anzahl an Vertretern ist es sehr gut möglich, Vergleiche untereinander anzustellen und daraus typische Eigenschaften vor allem in Bezug auf die Hämbindung, wobei es sich im Ruhezustand um Fe^{III}-Häm handelt, abzuleiten. [34] Charakteristisch ist das Sequenzmotiv FXXGXXXCXG, das u. a. das Häm-koordinierende Cystein beinhaltet. [39, 112] Aus einem Datensatz von 18 nicht-redundanten

Proteinstrukturen ließ sich die Konsensussequenz GX[HR]XC[PLAV]G (Cys - Position 0) generieren, die die erwähnte Cytochrom-P450-Signatur bestätigte (Abb. 17). [112] Dabei sind die basischen Aminosäuren an Position -2 in elektrostatische Wechselwirkungen mit den Propionatseitenketten involviert, während den kleinen Aminosäuren an Position -4 und +2 Beiträge zur Flexibilität eingeräumt werden, um die Aminosäureseitenketten passend zum Häm auszurichten. Auffällig ist außerdem die Position +1, die sich durch hydrophobe Aminosäuren (Leucin, Alanin, Valin; für Cytochrom P450 speziell: Methionin, Isoleucin, Leucin) und Prolin auszeichnet. [112]

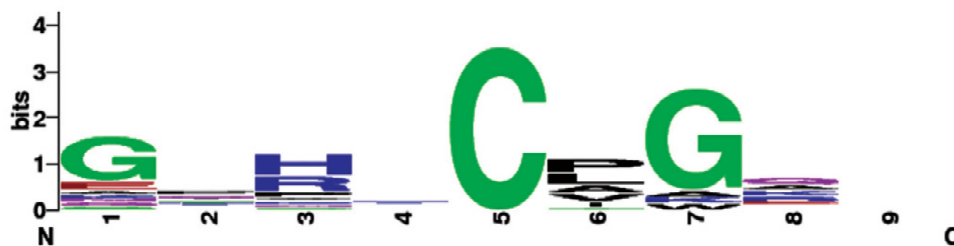


Abb. 17: Verteilung der umgebenden Aminosäuren in einem Datensatz aus 18 nicht-redundanten, Häm-bindenden, Cystein-basierten Strukturen (± 4 Aminosäuren im Abstand zum axial-kordinierenden Cystein). Auffällig ist die wiederkehrende Cytochrom-P450-Signatur GXXXCXG. [112]

2.4.2.2 Peroxidasen und Katalasen

Sequenzvergleiche der Peroxidasen führten zur Unterteilung in verschiedene Klassen. [40, 120] Einheitlich ist allen zunächst Fe^{III} -Häm, das pentakoordiniert durch Histidin als fünften Liganden vorliegt. [120] Eine Ausnahme stellen die Chloroperoxidase und die aromatische Peroxidase dar, die als fünften Liganden ein Cystein tragen. [59, 121] Das axiale Histidin wird in einer Hämbindetasche durch Wasserstoffbrückenbindung zu einem Aspartatrest und in den meisten Peroxidasen durch van-der-Waals-Kontakte zu einem Tryptophan stabilisiert. [120]

Die Peroxidase-Cyclooxygenasen sind von den gerade beschriebenen Peroxidasen aus Pilzen, Pflanzen und Bakterien zu differenzieren. Wichtigstes Unterscheidungskriterium ist die kovalente Verknüpfung des Fe^{III} -Häms mit dem Protein. Die bekanntesten Vertreter sind die Peroxidasen aus Vertebraten, zu denen die Myeloperoxidase und die Lactoperoxidase gehören. [120] Verknüpfungen zu Häm erfolgen hier über kovalente Bindungen zwischen den Methylgruppen des Porphyrinrings und Aspartat- und Glutamatseitenketten der Proteine (vgl. Kapitel 2.1, Abb. 1). Bekannt ist aber auch die Bildung einer Sulfoniumbindung zwischen Methionin und der Vinylgruppe des Häms in der Myeloperoxidase (vgl. Kapitel 2.1, Abb. 1). [6, 120]

Eine spezielle Peroxidase stellt die Katalase dar, die für die Disproportionierung von Wasserstoffperoxid in Zellen verantwortlich ist. Im aktiven Zentrum des tetrameren Enzyms findet sich pro Untereinheit ein Hämmolekül, das Tyrosin als axialen Liganden trägt. [122, 123] Es stellt damit im Rahmen der Komplexierung des Häms unter den zahlreichen Vertretern aus Globinen, Peroxidasen, Cytochromen und anderen dadurch eine Besonderheit dar, die bisher nur für wenige Proteine bekannt ist. [123]

Sowohl im Fall der Peroxidasen als auch bei den Katalasen ist das Auftreten einzelner Aminosäuren in der unmittelbaren Umgebung des Hämliganden charakteristisch (Abb. 18). [108, 124]

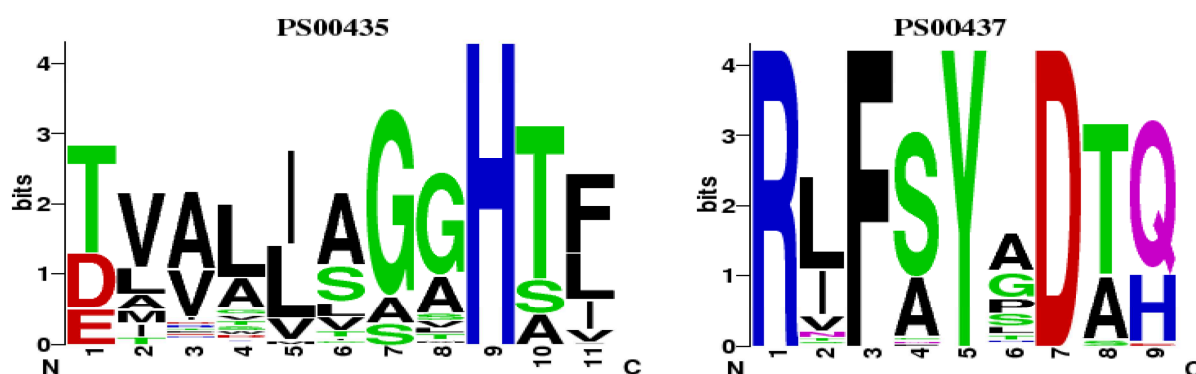


Abb. 18: Verteilung der umgebenden Aminosäuren für Peroxidasen (Prosit-ID PS00435) und Katalasen (Prosit-ID PS00437). Auffällig ist in beiden Fällen der zunächst hohe Anteil hydrophober und polarer Aminosäuren. [108, 124]

2.4.2.3 Cytochrom c

Eine weitere Gruppe, die Fe^{II} -Häm über Histidin als axialen Liganden koordiniert, sind die Cytochrom-c-Proteine, deren Hauptaufgabe der Elektronentransport ist. Dem Histidin gegenüber findet sich als zweiter axialer Ligand des Häms in den meisten Fällen ein Histidin oder ein Methionin. [118] Cytochrom c trägt charakteristischerweise Häm c, dass über zwei Cysteine in unmittelbarer Nähe des axialen Histidins in Form des konservierten CXXCH-Motivs mit diesem kovalent verknüpft ist (Abb. 1, Abb. 19A). [112, 118]

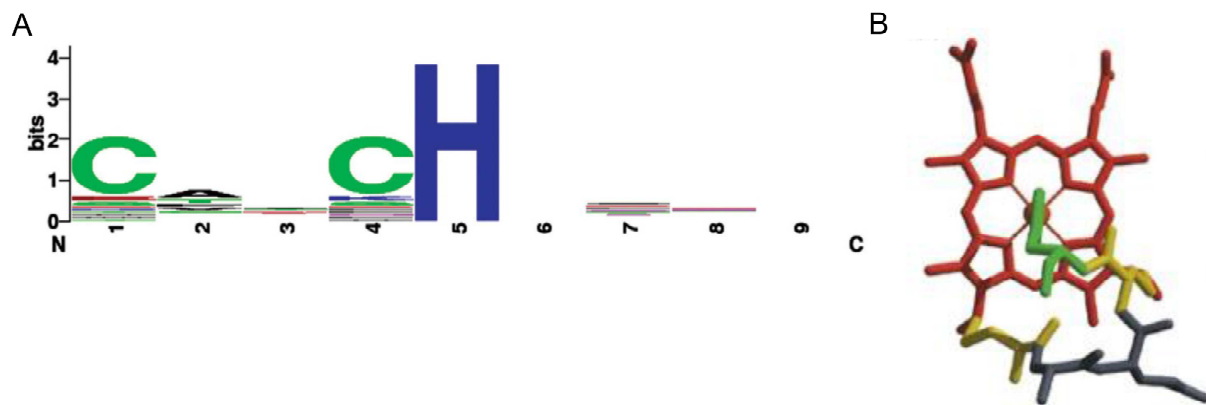


Abb. 19: (A) Verteilung der umgebenden Aminosäuren in einem Datensatz aus 32 nicht-redundanten, Häm-bindenden, Histidin-basierten Strukturen (± 4 Aminosäuren im Abstand zum axial-kordinierenden Cystein). Auffällig ist die wiederkehrende Cytochrom-c-Signatur CXXCH. [112] (B) Cytochrom c aus Pferdeherz verdeutlicht eine mögliche Orientierung des Histidins nach dem Bruch der helikalen Struktur, in die die beiden Cysteine involviert sind. [118]

Abweichend von diesem Motiv findet man aber auch als Variante zum Beispiel bei der Cytochrom c_{552} Nitrit-Reduktase an Stelle des Histidin ein Lysin (CXXCK). [118] Außerdem sind Versionen der Cytochrom-c-Proteine bekannt, bei denen das erste Cystein gegen Phenylalanin oder Alanin ausgetauscht ist (A/FXXCH) oder ein bis zwei weitere beliebige Aminosäuren eingeschoben wurden (CXXXCH, CXXXXCH). [5, 118]

Strukturell äußert sich die Ausnutzung des klassischen CXXCH-Motivs in einer helikalen Struktur, bei der die Cysteine auf der gleichen Seite der Helix liegen und darüber das Häm fixieren können (Abb. 19B). Häufig kommt es nach dem zweiten Cystein zu einem Bruch in der helikalen Faltung, die in eine Schleife übergeht und so die Ausrichtung des axialen Histidin-Liganden zum Fe^{II} -Ion ermöglicht. [5, 118]

2.4.2.4 Weitere Motive

Exemplarisch für verschiedene Hämbindemotive wurden in den Kapiteln 2.4.2.1 bis 2.4.2.3 einige der Sequenzmotive für permanent nicht-kovalent- sowie kovalent-verknüpfte Häm-Protein-Komplexe beschrieben. Abschließend zu den bekannten HBMs sollen in diesem Kapitel ergänzend einzelne weitere solcher Motive aufgelistet und kurz erläutert werden.

Für den Elektronentransport sind hier zunächst die Cytochrom-b₅-Proteine zu nennen. Sie komplexieren das Fe -Ion des Häms über zwei Histidine, wobei sich das proximale Histidin durch ein darauffolgendes Prolin und zwei Glycine auszeichnet (HPGG). [37, 111] Das Häm ist in eine Hämbindetasche des Cytochrom-b₅-Strukturtyps eingepasst, dass sich in verschiedenen weiteren Proteinen, wie Flavocytochrom b₂ aus *S. cerevisiae* und Nitrat-Reduktase aus *Nicotiana tabacum* wiederfindet. [37]

Ebenfalls über ein proximales Histidin koordinieren die Globinstrukturen, wie sie aus Hämoglobin, Myoglobin u. a. bekannt sind, ihre prosthetische Gruppe. [111] Der axiale Ligand des pentakoordinierten Komplexes wird dabei aus einer Helix bereit gestellt, während die Bindung des Häms durch zahlreiche hydrophobe Interaktionen von weiter entfernten Aminosäuren stabilisiert wird. [19, 20] Dennoch finden sich (z. B. für Hämoglobin) auch Bindungsbeiträge durch Aminosäuren in unmittelbarer Umgebung zum proximalen Histidin wieder, die sich beim Hämoglobin und Myoglobin in der allgemeinen Sequenz (L/X)XXXH zusammenfassen lassen. [20]

Abschließend zu den HBMs seien die zum Teil unterschiedlichen Motive aus den Häm-basierten Gassensoren zu erwähnen. Auch hier sind zunächst Einflüsse aus unterschiedlich gefalteten Domänen für die Bindung des Proteins relevant. Klassische Motive stellen u. a. die PAS-Domäne (z. B. NPAS2) oder die catabolite activator protein (CAP)-Struktur (z. B. CooA) als Bestandteil dieser Proteine dar. [111, 125] Üblicherweise wird einer der beiden Liganden des Fe^{III} -Häms im Ruhezustand der Gassensoren durch ein Cystein oder ein CP-Motiv (vgl. Kapitel 2.4.3.2) beigetragen, während der zweite durch eine variable Aminosäure besetzt wird. [25, 59] Im Gas-gebundenen Zustand findet sich in den meisten Fällen hingegen ein Wechsel zum Fe^{II} -Häm, das Histidin und das entsprechende Gas (CO , NO) als axialen Liganden trägt. [25, 59] Bereits beim Wechsel des Redoxzustands des Häms zu Fe^{II} findet man einen Wechsel der Liganden. [25, 59] Ein klassisches Beispiel stellt der Häm-basierte Gassensor CooA dar, der diese Kriterien veranschaulicht. Eine Besonderheit von CooA ist, dass es Prolin als axialen Liganden ohne Einfluss von CO trägt. Der sechste Ligand variiert dabei redoxabhängig zwischen Cystein (Fe^{III} -Häm) und Histidin (Fe^{II} -Häm). Unter Einfluss von CO kommt es zum erwähnten Wechsel der Liganden und ein Fe^{II} -Häm-Komplex mit Histidin und CO als Liganden entsteht. [25, 26, 59]

Wie bereits betont, spielen bei vielen HBMs dreidimensionale Effekte der Faltung der Hämbindetaschen eine wichtige Rolle. Es ist dabei dennoch ein klarer Einfluss durch unmittelbar benachbarte Aminosäuren in Bezug auf den axialen Hämliganden nicht von der Hand zu weisen. Deutlicher wird dieser Zusammenhang bei den vorrangig oberflächenlokalisierten HRMs.

2.4.3. Charakteristische Merkmale Häm-regulatorischer Motive

2.4.3.1 CXXCH-Motive

Für zahlreiche Proteine, die in Kapitel 2.2.2 genannt wurden, sind bisher keine genauen Bindungsstellen hierin erläutert. Eine der Ausnahmen darunter stellt hSlo1 dar. Der Kaliumionenkanal trägt ein CXXCH-Motiv in seinem zytosolischen C-terminalen Ende, dass ausgehend von der Sequenz identisch zu den Cytochrom-c-Motiven der HBMs ist (vgl.

Kapitel. 2.4.2.3). Analog dazu erfolgt die Koordination des Hämin über Histidin. Der signifikante Unterschied liegt jedoch in der transienten und damit reversiblen Häminbindung. Im Fall der Interaktion von hSlo1 mit Hämin beobachtet man keine kovalente Bindung des Hämins an den Kanal. Der Hämin-induzierte Effekt ist im Gegenteil auswaschbar und die durch Hämin verursachte Hemmung umkehrbar. [24, 53] Die Notwendigkeit der Cysteinreste wurde nachgewiesen, während eine kovalente Verknüpfung damit jedoch ausgeschlossen werden konnte. [53] Für diese wird ein Thiol-Disulfid-Schaltermechanismus vermutet, der die Empfindlichkeit der Hämregulation des Kanals erheblich beeinflussen kann. Dabei ist eine reduzierte Bindungskapazität von Hämin für die oxidierte Variante des Motivs beschrieben, während das reduzierte Protein effektiver in hohen nanomolaren Konzentrationen auf Hämin reagiert. [91] Eine strukturelle Bestätigung für die Bindung an dieses Sequenzmotiv ist für keine der beiden Varianten bisher verfügbar und konnte daher nur über Mutationsstudien und Untersuchungen am Protein selbst sowie an Peptiden, die das HRM enthalten, überprüft werden. [53, 91]

Bisher stellt hSlo1 das einzige Beispiel eines HRMs dar, dass die Kennung der Cytochrom-c-Proteine trägt.

2.4.3.2 CP-Motive

Ursprünglich wurde der Begriff HRM für Hämin-bindende Sequenzen aus ALAS2 aus fünf Aminosäuren geprägt, die als zentrales Motiv das Dipeptid Cysteinyl-Prolin aufwiesen. [57] Daraufhin schlossen sich weitere Studien an HAP1 an, die ebenfalls das Vorhandensein von CP-Motiven/HRMs als essentiellen Bestandteil der Bindung von Hämin zur Regulation der Proteinaktivität nachwiesen. Basierend auf diesen Untersuchungen wurden weitere potentielle Proteine mit solchen CP-Motiven vorgeschlagen. [55] Seitdem sind weitere Vertreter dazugekommen, die CP-Motive als HRMs aus funktioneller Sicht zu einer Klasse von Hämsensoren zusammenfassen lassen (vgl. Kapitel 2.2.2, Abb. 7, Tab. 1).

Erste Analysen zur weiteren Verallgemeinerung des Motivs wurden durch Steiner *et al.* durchgeführt, die das CPX-Motiv (X - Val, Met, Ile, Leu) für Cytochrom-c-Häm-Lyasen definierten. [126] Dass es entsprechende Einflüsse neben der CP-Charakteristik geben muss, haben auch Li *et al.* festgestellt, die in einem Datensatz aus nicht-redundanten, Häm-bindenden Proteinen mit bekannter Struktur nur für ca. ein Viertel aller CP-Sequenzen eine Hämbindung bestätigen konnten (siehe auch Abb. 17). [112] Yao und Mitarbeiter zeigten bereits zuvor, dass aus humanen Proteinen etwa ein Viertel aller bekannten Vertreter ein oder mehrere potentielle CP-Motive tragen. [89] Diese Informationen zeigen das große Potential der Untersuchungen an HRMs, insbesondere CP-Motiven in Proteinen. Nichtsdestotrotz ist eines der großen Defizite der bisher bekannten CP-Motive der Mangel an

aufgelösten Strukturen im Komplex mit aber auch ohne Häm/Hämin. [5, 119] Der dafür bisher einzige Vertreter ist Rev-erb β , der neben dem Cystein des CP-Motivs axial am Hämin aber noch ein Histidin als sechsten Liganden trägt. [75] Im Gegensatz dazu steht z. B. das CP-Motiv aus Irr für das mittels EPR-Untersuchungen eine Pentakoordination des Hämins nachgewiesen werden konnte. [119] Außerdem existiert auch die Möglichkeit eines Thiol-Disulfid-Schaltermechanismus, der die Bindung von Hämin reduzieren kann, wie es für das Cystein aus dem CP-Motiv der HO-2 bekannt ist. [59, 66]

Tab. 1: Auswahl von Proteinen mit CP-Motiven als HRMs und Proteinen, die sich spektroskopisch ähnlich verhalten, aber kein CP-Motiv besitzen. Modifiziert und erweitert nach [127].

Protein	Organismus	Sequenz des HRMs	Referenz
<u>CP-Motive</u>			
ALAS1	<i>R. norvegicus</i>	R CP FLS K CP FLA	[57, 61]
ALAS2	<i>M. musculus</i>	R CP VLA R CP ILA	[57, 128]
Bach1	<i>H. sapiens</i>	E CP WLG N CP FIS P CP YAC D CP LSF	[129]
HO-2	<i>R. norvegicus</i>	K CP FYA N CP FRT	[130]
HRI	<i>M. musculus</i>	A CP YVM	[131]
IRP2	<i>H. sapiens</i>	L CP FHL	[54]
Per2	<i>H. sapiens</i>	S CP AVP	[56]
STC2 ^[a]	<i>H. sapiens</i>	K CP AIR	[132]
Rev-erb β	<i>H. sapiens</i>	V CP LSK	[75]
ATE1	<i>M. musculus</i>	S CP KMR	[58]
Irr	<i>B. japonicum</i>	G CP WHD	[65, 119]
HAP1	<i>S. cerevisiae</i>	K CP VYQ K CP VDH R CP IDH K CP INH K CP VDH (2x) R CP VDH	[55]
CC ₁ HL	<i>S. cerevisiae</i>	K CP VDE	[126]
<u>Cys-basierte Motive</u>			
STC1 ^[a]	<i>H. sapiens</i>	RCSTFQ	[127]
ArgRS	<i>H. sapiens</i>	QCNSAM	[80]
PpsR	<i>R. sphaeroides</i>	MCIETA	[70]

^[a]STC1/2, Stanniocalcin 1/2.

CP-Motive sind aber auch aus Proteinen bekannt, die ein HBM besitzen (z. B. Chlorperoxidase, Cytochrom P450 154C1). [112] Es wird in diesem Zusammenhang dem Prolin eine besondere Rolle eingeräumt, das die Orientierung nachfolgender Sequenzabschnitte maßgeblich beeinflusst. [112, 119] Während in klassischen Hämoproteinen (z. B. Cytochrom P450 154C1) anschließend Wasserstoffbrückenbindungen

zum axialen Cystein die Bindung stabilisieren können, kommt es durch die lotrechte Ausrichtung des Prolins zur Hämebene zu einer Verminderung dieser Wechselwirkungen. [112, 119] Der Mangel an stabilisierenden Interaktionen ermöglicht dadurch eine schnelle Dissoziation des Hämin-Protein-Komplexes, wodurch der regulatorische Effekt der transienten Hämbindung generiert werden kann. [59]

2.4.3.3 Weitere Motive

Das Repertoire an HRMs ist mit den beiden oben genannten Motiven noch nicht erschöpft, deckt aber damit die bisher prominentesten Vertreter ab. Alle weiteren Motive stellen bisher einzelne Repräsentanten dar, deren Aktivität durch Häm moduliert werden, kann aber vergleichbar zu hSlo1 Einzelfälle darstellen.

Im Falle der Ionenkanäle lässt sich unmittelbar das HRM des Kaliumionenkanals Kv1.4 ergänzen. [90] Ein CXXH-Motiv konnte für diesen charakterisiert werden, das sich in anderen Kaliumionenkanälen wie Kv1.1 β ebenfalls wiederfindet. In beiden Fällen kommt es nach Applikation von Hämin zu einer Hemmung der Inaktivierung der Kanäle, wobei bisher ausschließlich für Kv1.4 eindeutige Nachweise durch Mutationsstudien für die Bindung des Hämins erbracht wurden. [90]

DGCR8 wird als Hämin-reguliertes Protein verstanden, dass in einem Homodimer über ein Cystein von jeder Untereinheit jeweils einen axialen Liganden für die Bindung des Hämins stellt. Dennoch induziert die Bindung von Hämin nicht ausschließlich die Bildung des Dimers, sondern steigert vorrangig die Aktivität des Proteins. [78, 79]

Abschließend zu den HRMs seien die Sequenzen erwähnt, die häufig in Anlehnung an CP-Motive diskutiert werden, da sie nachweislich über Cystein Hämin binden können und sich spektroskopisch ähnlich wie CP-Motive verhalten, aber kein Prolin nach dem Cystein tragen. Dazu gehören bisher die Proteine ArgRS, PpsR (vgl. Kapitel 2.2.2) und Stanniocalcin 1 (STC1) (Tab. 1). [70, 80, 127] Da sie aber auch keine Zusammenfassung ihrer Sequenz auf Grund von ähnlichen oder identischen Aminosäuren zulassen, ist bisher unklar, ob und welche zusätzlichen Einflüsse ihre Hämbindung modulieren.

3 Zielstellung

Auf Grundlage der vorliegenden Arbeit sollen zukünftig Aussagen zu potentiell Häm-bindenden Sequenzen in Proteinen getroffen werden können. Ein umfangreiches Verständnis für die umgebenden Aminosäuren in Relation zum Hämliganden (koordinierender Aminosäurerest) ist dabei sehr nützlich und kann helfen Kandidaten mit potentiell niedriger Affinität für Hämin bereits vor den detaillierten Studien zu eliminieren. Mit Hilfe einer kombinatorischen Peptidbibliothek können solche Sequenzen identifiziert werden, was die Anwendung dieser Methode im Rahmen der vorliegenden Arbeit begründet. Eine Methode für das Screening mit dem Liganden Hämin soll dazu erarbeitet werden.

Zur Validierung der Ergebnisse aus dem Screening und der Auswertung der identifizierten Hämin-bindenden Sequenzen sollten ausgewählte, repräsentative Vertreter der Voruntersuchungen anschließend hinsichtlich ihrer Bindungsaffinität mit UV/Vis-Spektroskopie eingeschätzt und in Kompetitionsstudien mit dem humanen Ionenkanalprotein Slo1 unter physiologischen Bedingungen auf ihre Bindekapazität evaluiert werden.

Daraus abgeleitet sollte eine erste Einteilung der Peptide in Gruppen entsprechend ihrer Affinität und ihrem Bindungsverhalten erfolgen.

Zur umfangreichen Auswertung der jeweiligen Klassen sollten besonders repräsentative, hochaffine Vertreter für eine Gruppe ausgewählt werden und neben funktionellen Studien auch strukturell detaillierter charakterisiert werden. Da es sich dabei jedoch um häufig sehr zeitaufwändige Verfahren handelt, sollte Ziel dieser Arbeit eine erste Charakterisierung der Vertreter der Cys- und Cys-Pro-basierten Peptide im Komplex mit Hämin sein, da hier auf die bisher in der Literatur beschriebenen Sequenzen für Häm-regulatorische Motive zurückgegriffen werden konnte, die zu großen Teilen Cys- oder Cys-Pro-basiert sind.

Darüber hinaus sollten die erhaltenenen Ergebnisse der klassifizierenden Untersuchungen zur Untermauerung ihres Wertes unter Zuhilfenahme von Protein-Datenbanken auf die Ableitbarkeit potentiell neuer Häm-regulierter Proteine überprüft werden. Anschließend sollten ausgewählte Vertreter daraus genauer charakterisiert und idealerweise auch auf Proteinebene für die Regulation durch Häm als relevant ermittelt werden. Ein solcher Vertreter besäße in Folge der ermittelten Charakteristika schließlich ein großes Potential für eine Regulation durch Häm *in vivo* und könnte dadurch neue Anregungen für andere verwandte und angelehnte Forschungsbereiche liefern.

4 Materialien und Methoden

4.1 Materialien

4.1.1 Chemikalien und Lösungsmittel

Festphasenpeptidsynthese

Vor der Verwendung von N,N-Dimethylformamid und Dichlormethan wurde darauf geachtet, dass diese zunächst über Molsieb A4 vorgetrocknet wurde.

Zur Einstellung des pH-Werts verschiedener Puffer wurden als Maßlösungen 0,1 N Salzsäure (ROTH) oder 0,1 N Natronlauge (ROTH) benutzt.

Reagenzien zur Peptidsynthese, Kopplung und Abspaltung

ACROS:	Diisopropylethylamin (DIEA)
FLUKA:	Phenol, Thioanisol, Ethandithiol, Natriumthiophenolat, Anisol
MINERALÖLE ALBERT/ VWR INTERNATIONAL:	Dimethylformamid (DMF), Dichlormethan (DCM), Diethylether
NOVABIOCHEM/ORPEGEN:	N-Hydroxybenzotriazol (HOBt)
IRIS BIOTECH GmbH:	2-(1H-Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethylguanidiniumhexafluorophosphat (HBTU)
VWR INTERNATIONAL/ FISHER SCIENTIFIC:	Wasser und Acetonitril (HPLC-gradient grade)
SIGMA-ALDRICH:	N-Methylmorpholin (NMM)
ROTH:	tert.-Butanol
VWR INTERNATIONAL:	Piperidin
MERCK:	Trifluoressigsäure (TFA)

Aminosäurederivate und Harze

CBL/IRIS BIOTECH GmbH:	Rink-Amid-MBHA-Harz
INTAVIS AG:	Tentagel-Amid-Harz
IRIS BIOTECH GmbH/ ADVANCED CHEMTECH:	Tentagel-S-NH ₂ -Harz
IRIS BIOTECH:	Fmoc-L-Glu(O ^t Bu)-OH
ORPEGEN:	Fmoc-L-His(Trt)-OH, Fmoc-L-Ala-OH, Fmoc-L-Cys(Trt)-OH, Fmoc-L-Pro-OH, Fmoc-L-Trp(Boc)-OH, Fmoc-L-Asp(O ^t Bu)-OH, Fmoc-L-Ile-OH, Fmoc-L-Tyr(O ^t Bu)-OH, Fmoc-L-Asn(Trt)-OH, Fmoc-L-Gln(Trt)-OH, Fmoc-L-Met-

	OH, Fmoc-L-Ser(O ^t Bu)-OH, Fmoc-L-Lys(Boc)-OH, Fmoc-L-Leu-OH, Fmoc-L-Phe-OH, Fmoc-L-Val-OH, Fmoc-L-Gly-OH, Fmoc-L-Arg(Pbf)-OH
BACHEM:	Fmoc- β -Ala-OH
NOVABIOCHEM/FLUKA:	Ac-L-Ala-OH, Ac-L-Gly-OH, Fmoc-L-Nle-OH

Screening und partieller Edman-Abbau der Peptidbibliothek

FLUKA:	Hämin, Dimethylsulfid, Triethylamin
ROTH:	Hepes, NaCl, Tween 20, Gelatin
FISHER SCIENTIFIC:	Methanol (HPLC-gradient grade)
IRIS BIOTECH GmbH:	Nicotinsäuresuccinimidester (Nic-OSu)
SIGMA-ALDRICH:	Phenylisothiocyanat (PITC), Ammoniumiodid, α -Cyano-4-hydroxymethylsäure
VWR INTERNATIONAL:	Dichlormethan und Wasser (HPLC-gradient grade)
MERCK:	Bromcyan, TFA, Pyridin

UV/Vis-Spektroskopie, Ramanspektroskopie

ROTH:	Hepes
FLUKA:	Hämin
VWR INTERNATIONAL/	
FISHER SCIENTIFIC:	Wasser (HPLC-gradient grade)
MERCK:	Fe ^{III} -chlorid

NMR-Spektroskopie

SIGMA-ALDRICH:	Co ^{III} -Protoporphyrin IX
FRONTIER SCIENTIFIC:	Ga ^{III} -Protoporphyrin IX
VWR INTERNATIONAL/	
FISHER SCIENTIFIC:	Wasser (HPLC-gradient grade), D ₂ O
ROTH:	NaCl

Peptidanalytik (Dünnschichtchromatographie, Aminosäureanalyse, HPLC, Massenspektrometrie)

VWR INTERNATIONAL/	
FISHER SCIENTIFIC:	Wasser und Acetonitril (HPLC-gradient grade)
MACHEREY-NAGEL:	DC-Fertigplatten ADAMANT UV ₂₅₄
ROTH:	Eisessig
RIEDEL-DE HAËN:	Pyridin

SIGMA-ALDRICH:	α -Cyano-4-hydroxymethylsäure
CHEMAPOL:	Ninhydrin
MERCK:	Salzsäure (37%), TFA
SERVA:	<i>o</i> -Tolidin
LABORSERVICE ONKEN:	Probenverdünnungspuffer
FLUKA:	n-Butanol, Essigester, 25% Ammoniak, KMnO_4 , Kaliumiodid, Isopropanol, Aceton, Methanol

Dipeptidylpeptidase 8-Inhibitortest

BACHEM:	H-Ala-Pro- <i>p</i> -Nitroanilid
FLUKA:	Hämin
ROTH:	Tris-HCl, NaCl
SIGMA-ALDRICH/ BPS BIOSCIENCE:	Dipeptidylpeptidase 8
MERCK:	Fe^{III} -chlorid
FRONTIER SCIENTIFIC:	Ga^{III} -Protoporphyrin IX, Zn^{II} -Protoporphyrin IX, Protoporphyrin IX
VWR INTERNATIONAL/ FISHER SCIENTIFIC:	Wasser (HPLC-gradient grade)

4.1.2 Puffer und Lösungen

4.1.2.1 Ansetzen der Häminlösung

Die Häminlösungen wurden nach zwei verschiedenen Vorschriften (A, B) hergestellt.

In Protokoll A wurde Hämin unter Lichtausschluss mit 30 mM NaOH oder KOH angelöst, so dass unter regelmäßigem Durchmischen nach ca. 20-30 Minuten eine 1 mM Lösung resultierte. Diese wurde anschließend mit Puffern weiterverdünnt.

Für Protokoll B wurde Hämin unter Lichtausschluss zunächst mit 1 N NaOH angelöst, so dass unter regelmäßigem Durchmischen nach ca. 20-30 Minuten eine 7,8-11,7 mM Lösung entstand. Diese wurde mit Puffer oder Wasser verdünnt und abschließend mit der gleichen Menge 1 N HCl analog zur verwendeten Base neutralisiert. Die resultierende Häminlösung hatte eine Konzentration von 400 - 600 μM (modifiziert nach [133]).

Lösungen von Protoporphyrin IX-Derivaten wie Co^{III} -Protoporphyrin IX oder Ga^{III} -Protoporphyrin IX wurden ausschließlich nach Protokoll B hergestellt.

4.1.2.2 Herstellung der Peptid-Hämin-Komplexe

Methodenabhängig wurden verschiedene Protokolle zur Herstellung der Peptid-Hämin-Komplexe verwendet.

Für die UV/Vis-Messungen und die Kompetitionsstudien wurde Hämin nach Protokoll A präpariert, verdünnt und mit dem bereits angelösten Peptid vereinigt.

In den anderen spektroskopischen Verfahren (Resonanz-Ramanspektroskopie, NMR-Spektroskopie), sowie für den Dipeptidylpeptidase-8-Inhibitortest wurde Hämin nach Protokoll B angelöst. Anschließend wurde diese Häminlösung direkt auf das lyophilisierte Peptid gegeben. In einzelnen Fällen wurde das Hämin aus Löslichkeitsgründen des Peptid-Hämin-Komplexes bereits vor der Neutralisation zum Peptid gegeben.

Alle Ansätze wurden nach der Präparation des Komplexes 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, bevor sie vermessen wurden.

4.1.2.3 Verwendete Puffer

Screening einer Peptidbibliothek mit Hämin

HBST buffer (pH 7,4):

30 mM Hepes

150 mM NaCl

0,01% Tween 20

Kompetitive Bindungsstudien

Intrazelluläre Badlösung (pH 7,4; eingestellt mit KOH):

100 mM Kaliumaspartat

15 mM KCl

10 mM EGTA

10 mM Hepes

Dipeptidylpeptidase-8-Inhibitortest

Test-Puffer (pH 8,0):

50 mM Tris-HCl

150 mM NaCl

Extrazelluläre Pipettenlösung, (pH 7,2; eingestellt mit NaOH):

103,6 mM Natriumaspartat

11,4 mM KCl

1,8 mM CaCl₂

10 mM Hepes

4.2 Methoden

4.2.1 Festphasenpeptidsynthese

4.2.1.1 Darstellung einer Peptidbibliothek – „Split and Pool“-Methode

Die Synthese der Peptidbibliothek erfolgte manuell nach der „Split and Pool“-Methode unter Anwendung der Fmoc/*tert*-Butyl-Schutzgruppen-Strategie. Als polymerer Träger wurde

Tentagel-S-NH₂-Harz mit einer Beladung von 0,3 mmol/g und einem Durchmesser von 90 µm verwendet. Die Fmoc-geschützten Aminosäuren, HBTU und HOBt (jeweils 4 Äquivalente) wurden in DMF nach Aktivierung mit DIEA (8 Äquivalente) für 1 Stunde bei Raumtemperatur gekoppelt und einmal pro Aminosäure wiederholt. Die Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe erfolgte mit 20% Piperidin/DMF. Zur Entfernung überschüssiger Reagenzien und Nebenprodukte wurde intensiv mit DMF (5 - 7x) und DCM (3x) nach jedem Abspaltungs- und Kopplungsschritt gewaschen. An Positionen mit beliebigen Aminosäuren wurden alle proteinogenen Aminosäuren als Fmoc-geschützte Derivate eingesetzt mit Ausnahme von Cystein und Methionin. Als isosterer Ersatz zu Methionin wurde Norleucin (Nle) verwendet. In Kopplungen bei denen Leucin oder Lysin gekoppelt wurden, wurde zusätzlich noch 5% N-terminal acetyliertes Glycin zur Kopplung dazugegeben. Analog erfolgte dies mit N-terminal acetyliertem Alanin bei Kopplungen von Norleucin. Dieser Zusatz erfolgte aus analytischen Gründen zur Sequenzbestimmung mittels Massenspektrometrie nach partiellem Edman-Abbau. [134]

Die in dieser Arbeit synthetisierte Bibliothek besaß folgende Sequenz: H-AAXXXX[C/H/Y]XXXXBBBBRM-Harz (X – alle proteinogenen Aminosäuren, inkl. Nle außer Met und Cys).

Nach Trocknung des Harzes wurden die Seitenkettenschutzgruppen mittels Reagenz K (2,25 g Phenol, 0,75 ml Ethandithiol, 1,5 ml Thionanisol, 0,3 ml Anisol, 1,5 ml bidest. Wasser, 30 ml TFA) bei Raumtemperatur für 1 Stunde abgespalten. Nach anschließendem Waschen mit TFA und DCM wurde die Peptidbibliothek bei -20 °C gelagert.

4.2.1.2 Darstellung der Peptide

Die Festphasenpeptidsynthese erfolgte automatisiert mittels Fmoc/*tert*-Butyl-Strategie an Harzen verschiedener Beladungen. Es wurden Rink-Amid-MBHA Harze (Beladung 0,56 - 0,73 mmol/g) und Tentagel-Amid-Harze (0,23 - 0,26 mmol/g) verwendet. Das Syntheseprotokoll der automatischen Synthese am Peptidsyntheseautomat EPS 221 der Firma ABIMED ist im Folgenden aufgeführt (Angaben jeweils pro 100 mg Harz):

1. Vorbereitung des Harzes

- 1 × waschen mit DMF I (2500 µl)
- 1 × waschen mit DCM (1400 µl)
- 1 × waschen mit DMF I (1400 µl)
- 1 × spülen mit Luft (300 µl)
- 1 × waschen mit DMF I (2500 µl)

2. Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe

- 2 × Fmoc-Abspaltung mit 20% Piperidin in DMF (1000 µl) - 6 min

- 1 × waschen mit DMF I (4000 µl)
- 1 × waschen mit DMF I (1400 µl)
- 1 × spülen mit Luft (300 µl)
- 2 × waschen mit DMF I (2000 µl)

3. Kopplung

- separates Mischen der Reagenzien: 450 µl HBTU, 125 µl NMM/DMF (1:1), 10 µl DMF II und 420 µl Aminosäure in DMF
- 1 × Kopplung - ca. 13 min
- separates Mischen der Reagenzien, siehe oben
- 1 × Kopplung - ca. 13 min
- 1 × waschen mit DMF I (3000 µl)
- 2 × waschen mit DMF I (1400 µl)
- 2 × waschen mit DMF I (2000 µl)

4. Finale Fmoc-Abspaltung und Waschen

- 2 × Fmoc-Abspaltung mit 20% Piperidin in DMF (1000 µl) - 20 min
- 1 × waschen mit DMF I (4000 µl)
- 1 × waschen mit DMF I (1400 µl)
- 1 × spülen mit Luft (300 µl)
- 2 × waschen mit DMF I (2000 µl)
- 4 × waschen mit DCM (1400 µl)
- 2 × spülen mit Luft (4500 µl)

Die Schritte 2 und 3 wurden entsprechend der Anzahl der zu koppelnden Aminosäuren wiederholt. Die eingesetzten Aminosäuren wurden in DMF in einer Konzentration von ca. 2,4 M gelöst. Die Konzentration von HBTU in DMF betrug 0,6 M. Nach Abschluss der Synthese wurde das Harz im Vakuum getrocknet.

Für die Kopplung der seitenkettengeschützten Fmoc-Derivate der 20 proteinogenen Aminosäuren und Fmoc-L-Norleucin-OH wurde HBTU als Kopplungsreagenz und NMM als Base zur Aktivierung verwendet. Eine 20%ige Piperidin/DMF-Lösung wurde zur Fmoc-Abspaltung genutzt.

Nach abgeschlossener Synthese wurde das Harz getrocknet und ausgewogen. Die Abspaltung erfolgte mit 150 µl Reagenz K (6 g Phenol, 2 ml Ethandithiol, 4 ml Thioanisol) und 1 ml 95% TFA pro 100 mg peptidbeladenes Harz auf Eis. Diese Mischung wurde 3 Stunden vorsichtig geschüttelt und anschließend in kalten Diethylether gefiltert. Der Filtrückstand wurde mehrfach mit 95% TFA gewaschen. Das erhaltene Filtrat wurde

zentrifugiert und der Überstand verworfen. Nach anschließenden Waschschritten (mind. 3x) des Pellets mit Diethylether wurde das ausgefällte Peptid in 80% *tert*-Butanol aufgenommen und lyophilisiert.

Eine Auflistung aller in dieser Arbeit so hergestellten Peptide sowie deren analytische Daten aus den in 4.2.3 durchgeführten Verfahren findet sich in Tabelle 2.

4.2.2 Screening und Analyse einer Peptidbibliothek mit Hämin

4.2.2.1 Screening einer Peptidbibliothek mit Hämin

Es wurden in analogen Ansätzen 20 - 45 mg der Peptidbibliothek intensiv in aufeinanderfolgenden Schritten mit Dichlormethan, Methanol und bidestilliertem Wasser in micro-Biospin Säulen (0,8 ml, von BIO-RAD). Anschließend wurde das Harz für 1 Stunde mit Gelatine-haltigem (0,1%) HBST-Puffer inkubiert. Danach folgte ein kurzer Waschschriff mit bidestilliertem Wasser. Daraufhin wurde die Probe für 4 - 20 Stunden mit 0,01 - 100 nM Hämin in HBST-Puffer (800 µl) vorsichtig geschüttelt. Nach dieser Inkubation wurde das Harz mit bidestilliertem Wasser gewaschen und auf eine Petrischale überführt. Unter Nutzung des Stereomikroskops Stemi DV4 (CARL ZEISS) wurden mit Hilfe einer Pipette Beads selektiert, die nach der Inkubation mit Hämin eine charakteristische grüne bis gelbe Färbung aufwiesen. Diesen gefärbten Beads wurden entweder mit Edman-Abbau oder Massenspektroskopie-gekoppeltem partiellem Edman-Abbau hinsichtlich ihrer Peptidsequenz analysiert.

4.2.2.2 Analyse einer Peptidbibliothek mit Edman-Abbau

Die aus dem Screening der Peptidbibliothek selektierten, gefärbten Beads wurden einzeln mittels Edman-Abbau an einem Procise 494 Protein Sequencer (APPLIED BIOSYSTEMS) analysiert. Sie wurden dazu ohne weitere Vorbehandlung auf eine für das Gerät vorgesehene Membran aufgetragen und anschließend sequenziert. Durch Vergleich mit einem Standard ließen sich die Aminosäuren des jeweiligen Zyklus identifizieren. Diese Arbeiten wurden in Kooperation mit Dr. Bernhard Schlott (Fritz-Lipmann-Institut, Jena) und der Proteome Factory AG (Berlin) durchgeführt.

Tab. 2: Hergestellte Peptide und deren analytische Charakterisierung.

Nr.	Peptidsequenz ^[a]	M _w (M _w th.)	präp. HPLC ^[d]	anal. HPLC t _R [min]	DC ^[m] R _f
1	AAAAHAAAA	746,67 ^[c] (722,38)	A	13,06 ^[g]	0,26 ^[o]
2	HHQYHARVA	1120,44 ^[b] (1116,57)	A	18,93 ^[g]	0,20 ^[p]
3	YNLLHBAFD	1107,12 ^[b] (1103,58)	B	19,24 ^[h]	0,51 ^[n]
4	YNEHHWHBA	1208,19 ^[b] (1204,55)	A	17,65 ^[i]	0,28 ^[o]
5	VFKEHPAFR	1131,02 ^[b] (1128,62)	A	15,03 ^[i]	0,23 ^[o]
6	AAAAAYAAAA	773,61 ^[c] (748,84)	A	18,79 ^[g]	0,47 ^[n]
7	FLENLYLER	1249,40 ^[b] (1244,62)	C	22,14 ^[i]	0,52 ^[n]
8	WYAAATKPS	1087,98 ^[b] (1084,53)	A	15,76 ^[i]	0,53 ^[o]
9	HPFPYIWKA	1161,44 ^[b] (1156,62)	D	13,92 ^[h]	0,56 ^[o]
10	RAFFYCKAC	1109,71 ^[b] (1106,50)	C	20,81 ^[i]	0,33 ^[o]
11	AAAACAAAA	686,55 ^[b] (688,32)	^[e]	15,86 ^[g]	0,24 ^[r]
12	RDQYCSPTK	1100,17 ^[b] (1095,51)	A	17,85 ^[g]	0,07 ^[q]
13	QFSQCRIBN	1110,61 ^[b] (1106,56)	^[e]	19,32 ^[i]	0,30 ^[o]
14	FYWDCNHYW	1336,02 ^[b] (1331,51)	E	17,08 ^[i]	0,54 ^[n]
15	YVSRCIBBA	1039,85 ^[b] (1035,58)	^[e]	24,79 ^[j]	0,44 ^[p]
16	RADICVHLN	1042,24 ^[b] (1038,53)	C	17,48 ^[i]	0,17 ^[p]
17	AFFYCKACH	1091,58 ^[b] (1087,46)	C	20,10 ^[i]	0,45 ^[o]
18	NVNLTSNHLLYHY WIAVSHKAPA	2647,55 ^[b] (2646,38)	B	18,14 ^[h]	0,31 ^[o]
19	VRMDTLAHVLYYP QKPLVTTRSM	2718,27 ^[b] (2717,45)	B	15,93 ^[h]	0,47 ^[o]
20	SGGLPAPSDFKCP IKEEIAITSG	2316,04 ^[b] (2315,18)	B	14,89 ^[h]	0,20 ^[o]
21	APSRCTWQL	1060,40 ^[b] (1059,52)	C	19,35 ^[j]	0,34 ^[n]
22	SSIPCLHYK	1046,48 ^[b] (1045,53)	A	27,78 ^[k]	0,21 ^[n]
23	DICVHLNRK	1098,78 ^[b] (1096,32)	E	16,01 ^[i]	0,77 ^[s]
24	SSIPCLFYK	1056,47 ^[b] (1055,54)	C	24,24 ^[j]	0,50 ^[n]
25	ALTGCPWHD	998,29 ^[b] (997,44)	E	18,87 ^[j]	0,45 ^[n]
26	SQSSCPAVP	874,33 ^[b] (873,39)	A	19,90 ^[j]	0,19 ^[n]
27	DESACPVM	1013,23 ^[b] (1012,39)	E	17,59 ^[i]	0,58 ^[o]
28	TPILCPFHL	1039,53 ^[b] (1038,31)	C	18,53 ^[i]	0,80 ^[o]
29	RPDGCPDEI	1000,41 ^[b] (999,44)	E	22,61 ^[i]	0,27 ^[o]
30	AAAACPAAA	715,35 ^[b] (714,34)	A	16,61 ^[i]	0,19 ^[n]
31	IGVVC PFVR	988,44 ^[b] (987,56)	B	14,31 ^[h]	0,58 ^[n]
32	QFSSCPHYW	1153,37 ^[b] (1152,47)	C	20,78 ^[j]	0,50 ^[n]
33	SEGGCP LIL	887,36 ^[b] (886,45)	C	13,23 ^[h]	0,61 ^[r]
34	ARLGCPVIP	924,46 ^[b] (923,53)	C	19,86 ^[j]	0,52 ^[n]
35	EDKDCPIKE	1075,49 ^[b] (1074,49)	E	19,90 ^[j]	0,86 ^[s]
36	DESACPVM	1013,30 ^[b] (1012,39)	A	16,69 ^[i]	0,44 ^[n]
HBP23	DAKEVKRAFFYCK ACHDDITDPK	2701,67 ^[b] (2699,20)	B	22,85 ^[i]	0,20 ^[t]

^[a]B, Norleucin. ^{[b],[c]}Massenpeaks wurden detektiert als: ^[b][M+H]⁺, ^[c][M+Na]⁺. ^[d]Es wird die verwendete Methode angegeben (vgl. Kapitel 4.2.3.1). ^[e]Die Trennungen zur Aufreinigung der Peptide wurden analytisch mit einem Gradient von 0-60% Eluent B in 60 min durchgeführt. ^{[f]-[i]}HPLC Bedingungen der analytischen HPLC: Eluent A: Wasser + 0,1% TFA; Eluent B: Acetonitril + 0,1% TFA: ^[f]10 - 40% Eluent B in 30 min, ^[g]0 - 30% Eluent B in 30 min, ^[h]20 - 50% Eluent B in 30 min, ^[i]20 - 60% Eluent B in 40 min, ^[j]10 - 50% Eluent B in 40 min, ^[k]0 - 60% Eluent B in 60 min, ^[l]0 - 40% Eluent B in 40 min. ^[m]DC, Dünnschichtchromatographie. ^{[n]-[t]}Die für die Dünnschichtchromatographie verwendeten Lösungsmittelsysteme waren folgende: ^[n]System 1, ^[o]System 2, ^[p]System 3, ^[q]System 4, ^[r]System 5, ^[s]System 6, ^[t]System 7.

4.2.2.3 Analyse einer Peptidbibliothek mit Massenspektrometrie-gekoppeltem partiellem Edman-Abbau

Unter Anwendung des partiellen Edman-Abbaus wurde zunächst eine Peptidleiter generiert. Dazu wurde das harzgebundene Peptid in aufeinanderfolgenden Zyklen mit variierenden Mischungen aus Nicotinsäure-N-hydroxysuccinimidester und Phenylisothiocyanat in Pyridin/Wasser (5:1) mit 0,05% Triethylamin für 5 Minuten inkubiert. Die verwendeten Verhältnisse für die jeweiligen Schritte der analysierten Bibliothek sind in Tabelle 3 dargestellt. Die Inkubation erfolgte für 5 Minuten unter vorsichtigem Schütteln. Vor dem nächsten Zyklus wurde das Harz mit Dichlormethan, Methanol und Trifluoressigsäure umgequollen und 2 x 5 Minuten mit Trifluoressigsäure gewaschen. Anschließend wurde es mit Wasser, Methanol, Pyridin und einer Mischung aus Pyridin/Wasser (2:1) mit 0,1% Triethylamin erneut umgequollen und der nächste Abspaltzyklus gestartet.

Tab. 3: Verwendete Verhältnisse von NicOSu und PITC für die Abspaltung bzw. das jeweilige Cappen und damit Blockieren während der einzelnen Zyklen des partiellen Edman-Abbaus.

Position	PITC:NicOSu ^[a]
A	7:1
A	7:1
X	6:1
X	6:1
X	5:1
X	5:1
C/H/Y	5:1
X	4:1
X	4:1
X	3:1
X	3:1

^[a] 1 Äquivalent entspricht 45 mM.

Nach dem abschließenden Zyklus des partiellen Edman-Abbaus wurde nach dem Waschen eine 200 mM Nicotinsäure-N-hydroxysuccinimidester-Lösung in Pyridin/Wasser (5:1) mit 0,05% Triethylamin für 5 Minuten unter vorsichtigem Schütteln mit dem Harz inkubiert. Es folgten erneut Waschschrte mit Dichlormethan, Methanol und Trifluoressigsäure zum Umquellen des Harzes.

Zur Abspaltung der Peptidleiter vom Harz wurde zunächst Methionin reduziert durch aufeinanderfolgende Zugabe von TFA, Dimethylsulfid (10 µl auf 1 ml TFA) und Ammoniumiodid (kleine Spatelspitze pro ml TFA) auf Eis. Nach 30 Minuten wurde dieser Ansatz mit Wasser auf eine Petrischale überführt und von dort die zu untersuchenden Beads jeweils in einzelne Reaktionsgefäße überführt.

Die Abspaltung der Peptidleiter vom Harz erfolgte mit Bromcyan in 70% TFA/Wasser (40 mg/ml). Es wurden pro Bead 20 µl Abspalllösung verwendet. Die Ansätze wurden über Nacht, dunkel bei Raumtemperatur inkubiert. Am Folgetag wurden die Proben zur Trocknung für 1 Stunde in die Gefriertrocknungsanlage gegeben und anschließend mit wenigen Mikrolitern Wasser (0,1% TFA) aufgenommen. Nach intensivem Durchmischen der Proben wurde dann die gleiche Menge gesättigte α -Cyano-4-hydroxymizinsäure, gelöst in 50% Acetonitril/Wasser (0,1% TFA), dazugegeben. Die Probe wurde erneut gemischt und anschließend auf die Platte für die MALDI-TOF-Massenspektrometrie aufgetragen. Die MALDI-TOF-Messungen erfolgten an einem Laser-Tec Research Massenspektrometer der Firma PERSEPTIVE BIOSYSTEMS.

4.2.3 Charakterisierung und Aufreinigung synthetisierter Peptide

4.2.3.1 Semipräparative HPLC

Für Peptide, für die eine größere Menge Substanz aufgereinigt werden musste, wurde die semipräparative HPLC an einer LC 8A-Anlage der Firma SHIMADZU durchgeführt, die mit einer Eurospher 100-Säule von der Firma KNAUER (C18 Reversed Phase, 250 x 32 mm, 5 µm Korngröße, 100 Å Porengröße) für Trennungen mit einem Probenumfang von 20 - 150 mg und einer Vydac 218TP1022 (C18 Reversed Phase, 250 x 22 mm, 10 µm Korngröße, 300 Å Porengröße) für Trennungen mit einem Probenumfang von 5 - 20 mg ausgestattet war. Folgende Bedingungen wurden verwendet:

Eluent A:	0,1% TFA in Wasser	
Eluent B:	0,1% TFA in 90% Acetonitril/Wasser	
Flussrate:	10 ml/min	
Detektion:	220 nm	
Injektionsvolumen:	3,6 ml	
Gradient 1:	0 - 50% Eluent B in 120 min	(Methode A)
Gradient 2:	15 - 65% Eluent B in 120 min	(Methode B)
Gradient 3:	10 - 60% Eluent B in 120 min	(Methode C)
Gradient 4:	20 - 70% Eluent B in 120 min	(Methode D)
Gradient 5:	5 - 55% Eluent B in 120 min	(Methode E)

Die für die Trennungen verwendeten Gradienten sind für jedes Peptid in Tabelle 2 aufgeführt.

4.2.3.2 Analytische HPLC

Die qualitative Analyse bzw. Aufreinigung der Peptide mittels HPLC wurde an einer LC 10AT-Anlage der Firma SHIMADZU durchgeführt, die mit einer Vydac 218TP54-Säule (C18 Reversed Phase, 250 x 4,6 mm, 300 Å Porengröße, 5 µm Korngröße) betrieben wurde. Das hier angewandte Eluentensystem war folgendes:

Eluent A:	0,1% TFA in Wasser
Eluent B:	0,1% TFA in Acetonitril
Flussrate:	1 ml/min
Detektion:	220 nm
Injektionsvolumen:	20 - 400 µl

Die für die Analytik der jeweiligen Peptide verwendeten Gradienten sind in Tabelle 2 aufgeführt. Aufreinigungen ausgewählter Peptide wurden mit einem Gradienten von 0 - 60% in 60 Minuten durchgeführt (vgl. Tab. 2).

4.2.3.3 Massenspektrometrie

MALDI-TOF-Messungen wurden an einem Laser-Tec Research Massenspektrometer der Firma PERSEPTIVE BIOSYSTEMS, an einem Ultraflex TOF/TOF Spektrometer der Firma BRUKER DALTONIK GMBH oder an einem Autoflex TOF/TOF Spektrometer der Firma BRUKER DALTONIK GMBH durchgeführt. Zur Vermessung der Proben wurden vorwiegend Pulver verwendet. Dazu wurden die Proben in 0,1% TFA in Acetonitril/Wasser (1:1) gelöst und mit gesättigter Matrixlösung (7-10 mg/ml) gemischt. Diese Lösungen wurden auf eine Gold-Platte aufgetragen und vermessen. Als Matrix wurde α -Cyano-4-hydroxymizinsäure verwendet.

Zum Teil wurden auch bereits gelöste Proben aus HPLC-Analysen verwendet. Diese wurden ebenfalls mit gesättigter Matrixlösung versetzt (1:1). Anschließend wurde wie bei den Pulvern verfahren.

Die Ergebnisse der MALDI-TOF-Massenspektrometrie der Peptide sind in Tabelle 2 angegeben.

4.2.3.4 Aminosäureanalyse

Zur Aminosäureanalyse der Peptide wurde der Aminosäureanalysator LC 3000 der Firma EPPENDORF-BIOTRONIK verwendet. Zur Vorbereitung der Proben wurden die

entsprechenden Peptide 24 Stunden mit 6 N Salzsäure bei 110 °C hydrolysiert. Die anschließende Detektion erfolgte mit Ninhydrin bei 570 nm und 440 nm durch Vergleich mit einem geeichten Aminosäurestandard.

Die Ergebnisse der Aminosäureanalyse (Aminosäurezusammensetzung) entsprachen den theoretischen Erwartungen. Der jeweils bestimmte Peptidgehalt wurde zur Konzentrationsbestimmung der Peptidlösungen für die spektroskopischen und physiologischen Tests herangezogen.

4.2.3.5 Dünnschichtchromatografie

Die Auftragung der in Methanol gelösten Peptide erfolgte auf Kieselgelplatten mit Fluoreszenzindikator. Anschließend wurden die Platten in folgenden Lösungsmittelsystemen analysiert:

- System 1: n-Butanol/Eisessig/Wasser (48:18:24, v/v)
- System 2: Pyridin/Essigester/Eisessig/Wasser (5:5:1:3, v/v)
- System 3: 25% Ammoniak/Isopropanol (3:7, v/v)
- System 4: *tert*-Butanol/Essigester/Essigsäure/Wasser (1:1:1:1, v/v)
- System 5: Methanol/Essigsäure (100:15, v/v)
- System 6: Wasser/Methanol/25% Ammoniak (25:25:7, v/v)
- System 7: Wasser (0,1% TFA)/Acetonitril (1:1, v/v)

Die Detektion erfolgte zunächst unter UV-Licht. Anschließend wurde die erhitzte Platte mit Ninhydrin-Lösung (0,5% Ninhydrin in Aceton) besprüht und unter Wärmezufuhr entwickelt. Die Proben auf den Platten wurden daraufhin unter Einwirkung von Chlor halogeniert und mit einer Mischung aus 2/3 *o*-Tolidin-Lösung (gesättigte *o*-Tolidin-Lösung in 2%iger Essigsäure) und 1/3 Kaliumiodid-Lösung (0,2% Kaliumiodid in Wasser) besprüht.

4.2.4 Analytik und Strukturaufklärung der Hämin-Peptid-Interaktion

4.2.4.1 UV/Vis-Spektroskopie und quantitative Auswertung

Die Peptide wurden bei konstanter Konzentration (20 - 40 µM) mit variierenden Konzentrationen Hämin (0,4 - 40 µM) in 100 mM Hepes-Puffer (pH 7,0) inkubiert (vgl. Kapitel 4.1.2.2). Als Referenz wurden sowohl Ansätze ohne Peptid als auch Ansätze ohne Hämin gemessen. Die Proben wurden jeweils 30 Minuten unter Lichtausschluss inkubiert. Anschließend erfolgte die Messung der Absorptionsspektren an einem der folgenden Geräte: Cary 100 UV-vis (AGILENT TECHNOLOGIES), V-650 UV-Vis Spectrophotometer (JASCO)

oder Multiskan GO Microplate Spectrophotometer (THERMO SCIENTIFIC). Zur Gewährleistung der Einheitlichkeit der Messungen an neuen Geräten wurde vor der Analyse bisher uncharakterisierter Peptide eine bekannte Kontrolle bestimmt.

Anschließend wurde die Bestimmung der Dissoziationskonstanten (K_D) der Peptide durchgeführt. Dazu wurden zunächst Differenzspektren durch Subtraktion des Spektrums einer Häminkonzentration und des Spektrums der Peptid-Konzentration vom Spektrum der Inkubation aus Häm in und Peptid derselben Konzentrationen angefertigt. Zur Ermittlung der K_D -Werte wurde das Absorptionsmaximum der Differenzspektren verschiedener Häminkonzentrationen bei einer bestimmten Wellenlänge quantifiziert. Die Berechnung erfolgte nach der von Bogdan *et al.* ermittelten Funktion [135]:

$$\Delta A = 0,5 \cdot \Delta \varepsilon \cdot (C_L + n \cdot C_P + K_D) - ((C_L + n \cdot C_P + K_D)^2 - 4 \cdot C_L \cdot n \cdot C_P)^{0,5}$$

ΔA Absorption der Differenzspektren bei einer Wellenlänge

C_L Häminkonzentration

C_P Peptidkonzentration

$\Delta \varepsilon$ Differenz der molaren Extinktionskoeffizienten des Häm in-Peptid-Komplexes und Häm in

K_D Dissoziationskonstante

n Anzahl der möglichen Bindungsstellen für Häm in am Peptid

Die Auswertung erfolgt mit Hilfe der Software QTIPlot Version 0.9.7.8 (Ion Vasilief).

4.2.4.2 Kompetitive Bindungsstudien

Die Expression der α -Untereinheit des hSlo1 BK-Kanals in *Xenopus* Oozyten sowie die elektrophysiologischen Kompetitionsmessungen wurden in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. S. H. Heinemann und Dr. N. Sahoo vom Institut für Biochemie und Biophysik der Friedrich-Schiller-Universität Jena durchgeführt.

Es wurden transfizierte *Xenopus* Oozyten verwendet, die in ihrer Plasmamembran die porenformende α -Untereinheit des humanen Slo1-Kanals exprimierten. Die Ionenströme des Kanals wurden in einem Patch-Clamp-Ansatz unter Generierung von Inside-Out-Patches vermessen. In der Pipette wurde als Puffer extrazelluläre Pipettenlösung und als intrazelluläres Medium die intrazelluläre Badlösung verwendet. Die Haltespannung betrug -100 mV und der Stromfluss des hSlo1 BK-Kanals wurden im 4 Sekunden-Intervall während einer 10 Millisekunden-Depolarisation auf 250 mV gemessen. Nach ca. 100 Sekunden wurde eine vorinkubierte Mischung aus Peptid und Häm in (1 μ M:100 nM bzw. 100 nM:100 nM) in

intrazellulärer Badlösung (vgl. Kapitel 4.1.2.3) direkt auf den Membran-Patch appliziert. In Fällen, wo keine Hämin-induzierte Senkung des Stroms auftrat, wurde nach einem intensiven Waschschrift reine Häminlösung (100 nM) auf den Patch gegeben, um dessen Hämsensitivität zu bestätigen. Die Analyse der Daten erfolgte mit der Software Fitmaster (HEKA ELEKTRONIK) und IgorPro (WAVEMETRICS). [136, 137]

4.2.4.3 Ramanspektroskopie

Die Untersuchungen mittels Ramanspektroskopie erfolgten in Kooperation mit Prof. Dr. J. Popp vom Institut für Physikalische Chemie der Friedrich-Schiller-Universität Jena, M. Klein vom Institut für Photonische Technologien in Jena sowie Dr. U. Neugebauer und K. Galler vom integrierten Forschungs- und Behandlungszentrum Sepsis und Sepsisfolgen in Jena.

Die Proben wurden wie unter 4.1.2.2 beschrieben nach Protokoll B mit einer finalen Pufferkonzentration von 25 mM Natriumphosphat, 65 mM NaCl (pH 7,0) präpariert. Die resultierenden Peptid-Hämin-Komplexe (1:1, 400 μ M) wurden an einem LabRam HR800-Spektrometer der Firma HORIBA/JOBIN-YVON bei 413 nm Anregungswellenlänge mit einer Leistung von 6 mW in der Objektebene vermessen. Für die Aufnahmen wurde ein Gitter der Größe 1800 Linien/mm verwendet. Die genauen Parameter des Geräteaufbaus sowie der exakten Datenauswertung können in Kühl *et al.* nachgelesen werden. [137]

4.2.4.4 Kernresonanzspektroskopie

NMR-Strukturuntersuchungen fanden in Zusammenarbeit mit Dr. M. Görlach, Dr. O. Ohlenschläger und N. Goradia vom Fritz-Lipmann-Institut in Jena statt.

Die Peptid-Hämin-Komplexe (1:1, 400 μ M) wurden dafür wie unter 4.1.2.2 nach Protokoll B mit einer finalen Pufferkonzentration von 25 mM Natriumphosphat, 65 mM NaCl (pH 7,0) vorbereitet und anschließend an einem Avance III Spektrometer der Firma BRUKER DALTONIK GMBH mit Protonenfrequenzen von 600 und 750 MHz analysiert. Es wurden für die Messungen Co^{III}-Protoporphyrin IX und Ga^{III}-Protoporphyrin IX als Ersatz für Hämin verwendet. Als Kontrolle wurde das ungebundene Peptid vermessen. Folgende Experimente wurden durchgeführt: [¹H,¹H]-TOCSY, [¹H,¹H]-DQF-COSY, [¹H,¹H]-NOESY, [¹H,¹H]-ROESY und [¹H,¹³C]-HSQC. Die anschließende Auswertung erfolgte durch O. Ohlenschläger und N. Goradia wie in [137] beschrieben.

4.2.5 Vorhersage und Analyse potentieller Häm-regulierter Proteine

4.2.5.1 Vorhersage potentieller Häm-regulierter Proteine an Hand vorgegebener Sequenzen

An Hand bekannter Sequenzen lassen sich mit Hilfe des ScanProSite-Werkzeugs die hinterlegten Proteine der PDB- und der UniProtKB/Swiss-Prot-Datenbank auf identische Motive durchsuchen. [124, 138] Aus den erhaltenen Resultaten wurden die Proteine nach Lokalisation der Sequenz auf der Proteinoberfläche (bei verfügbarer Kristallstruktur) und damit der möglichen Zugänglichkeit für Hämin in regulatorischen Prozessen bewertet. Außerdem wurden Ergebnisse ausgeschlossen, bei denen die in der potentiell Hämin-bindenden Sequenz befindlichen Aminosäuren in posttranslationalen Modifikationen (z. B. Disulfidbrücken, Zink-Finger-Motive, Phosphorylierungen, etc.) involviert gewesen wären.

4.2.5.2 Dipeptidylpeptidase-8-Inhibitortest

Die Messungen des Effekts von Hämin auf Dipeptidylpeptidase 8 wurden leicht modifiziert nach klassischen Inhibitorstudien durchgeführt. [139, 140]

Hämin, Ga^{III}-Protoporphyrin IX, Fe^{III}-chlorid, Zn^{II}-Protoporphyrin IX bzw. Protoporphyrin IX wurden nach Protokoll B in Test-Puffer (vgl. 4.1.2.2) 400 µM gelöst und seriell 1:1 bis zu einer Konzentration von 3,1 µM verdünnt. Dabei wurde zum Verdünnen die gleiche Lösung aus Protokoll B ohne Hämin oder ähnliche Komponenten hergestellt und verwendet. Substrat (H-Ala-Pro-*p*-Nitroanilid, 20 mM) und Dipeptidylpeptidase 8 (54 nM) wurden ebenfalls mit Test-Puffer angelöst. Auch vom Substrat wurde anschließend eine serielle 1:1-Verdünnung bis zu einer Konzentration von 0,31 mM durchgeführt. Alle Lösungen wurden anschließend bei 37 °C inkubiert. Hämin- und Substratlösungen wurden unter Lichtausschluss gelagert.

Zur Bestimmung des K_M-Wertes wurde in einer Mikrotiterplatte bei einem Gesamtvolumen von 100 µl und 37 °C gearbeitet. Das Enzym wurde bei verschiedenen Substratmengen (5 - 0,078 mM) in einer finalen Konzentration von 13,5 nM pipettiert. Die Detektion der Produktfreisetzung erfolgte alle 30 Sekunden für 30 Minuten bei 405 nm in einem Multiskan GO Mikroplattenspektrometer (THERMO SCIENTIFIC) als Triplikat. Zur Ermittlung des K_M-Werts wurde die Michaelis-Menten-Gleichung $v = ([S] \cdot v_{\max}) / ([S] + K_M)$ angewendet.

Der Einfluss der potentiellen Modulatoren Hämin und Ga^{III}-Protoporphyrin IX sowie Fe^{III}-chlorid, Zn-Protoporphyrin IX und Protoporphyrin IX wurde unter Einsatz verschiedener finaler Konzentrationen von 1,6 - 100 µM bei konstanter Substratkonzentration von 200 µM untersucht. Vor Zugabe des Substrats wurden das Enzym (13,5 nM final) und der jeweilige Modulator 15 Minuten bei 37 °C inkubiert. Nach Zugabe des Substrats wurde die Reaktion erneut 30 Minuten verfolgt. Anschließend wurde der IC₅₀-Wert unter Berücksichtigung

folgender Gleichung bestimmt: $v = ((A-B) / (1+([I] / IC_{50})^s)) + B$ mit v als Reaktionsgeschwindigkeit, A als maximale Aktivität des nicht-inhibierten Enzyms, $[I]$ als der Inhibitorkonzentration, s als der Hill-Anstieg und B als der minimalen Aktivität des inhibierten Enzyms. Die Reaktionsgeschwindigkeit ist dabei proportional der gemessenen Absorption aus der Freisetzung des *p*-Nitroanilins. [137]

Die Auswertung der jeweiligen Berechnungen erfolgt mit Hilfe der Software QTiPlot Version 0.9.7.8 (Ion Vasilief).

5 Ergebnisse und Diskussion

5.1 Screening einer Peptidbibliothek auf die Interaktion mit Häm

5.1.1 Konstruktion und Screening der Peptidbibliothek

Die Aktivität von Proteinen kann vielfältig durch allosterische Regulatoren beeinflusst werden. Dabei sind für die Erkennung bestimmte Abschnitte auf der Oberfläche der Proteine notwendig, die die Bindung solcher Effektoren gewährleisten.

Im Fall der Häm-regulierten Proteine findet man diese Eigenschaften für die Bindung von Häm als allosterischem Modulator wieder (vgl. Kapitel 2.2.2, 2.4.1, 2.4.3). [59] Dabei spielen HRMs eine wichtige Rolle für die Erkennung des Häms. Yao *et al.* unternahmen erste Ansätze, HRMs auf der Basis der CP-Motive, speziell des Dipeptids Cys-Pro, in einem computerbasierten Ansatz als Grundlage zu verwenden, um potentiell neue Häm-regulierte Interaktionspartner aus dem menschlichen Proteom vorherzusagen. Damit sollte das vielfältige Potential von Häm als möglicher Effektor verschiedener Proteine deutlich gemacht werden. [89]

In den Ausführungen zur Bedeutung der benachbarten Aminosäuren des axialen Liganden (vgl. Kapitel 2.4), wurde jedoch bereits deutlich, dass deren Interaktionen mit dem Häm vielfältig sein können und somit ebenfalls zur Bindung beitragen. Dieser Beitrag wird durch Untersuchungen mit Hilfe eines nur 2 Aminosäuren kurzen Sequenzabschnitts nicht ausreichend berücksichtigt. Li *et al.* führten hier Betrachtungen in der unmittelbaren Umgebungen des axialen Liganden (± 4 Aminosäuren) auf der Basis nicht-redundanter Protein-Häm-Komplexe durch (vgl. Kapitel 2.4.2.1, 2.4.2.3, Abb. 17, Abb. 19). [112] Dieser Ansatz erscheint nachvollziehbar in Bezug auf die Umgebung des axialen Liganden, deckt jedoch nur unzureichend die Menge bereits bekannter Häm-regulierter Proteine ab, da für diese mit Ausnahme von Rev-erb β [75] keine Strukturdaten existieren.

In einem ersten Ansatz wurde daher aus bekannten Beispielen für CP-Motive als Hauptvertreter der HRMs die Spezifität jeder einzelnen Aminosäure in einem vergrößerten Sequenzbereich (axialer Ligand ± 4 Aminosäuren) untersucht (Abb. 20). Für die darüber hinaus bekannten Beispiele Häm-regulierter Proteine und deren HRMs (vgl. Kapitel 2.4.1, 2.4.3) wurde von einer solchen Ableitung abgesehen, da in allen Fällen zu wenig Vertreter mit ähnlichen charakteristischen Sequenzabschnitten existieren.

Betrachtet man Abbildung 20 genauer, lässt sich feststellen, dass es neben dem CP-Motiv keine einzelne klar konservierte Aminosäure gibt. Dennoch weisen bis auf Position +4 alle umgebenden Aminosäuren eine hinreichende Konservierung bestimmter Aminosäuren an den jeweiligen Positionen auf, die mit zunehmender Nähe zum CP-Motiv steigt. Es lässt sich hieraus die Vermutung ableiten, dass die entscheidenden Interaktionen des Hämins mit dem

Protein vor allem im Bereich P-3 bis P+3 eines CP-Motivs als Repräsentant eines typischen HRMs stattfindet.

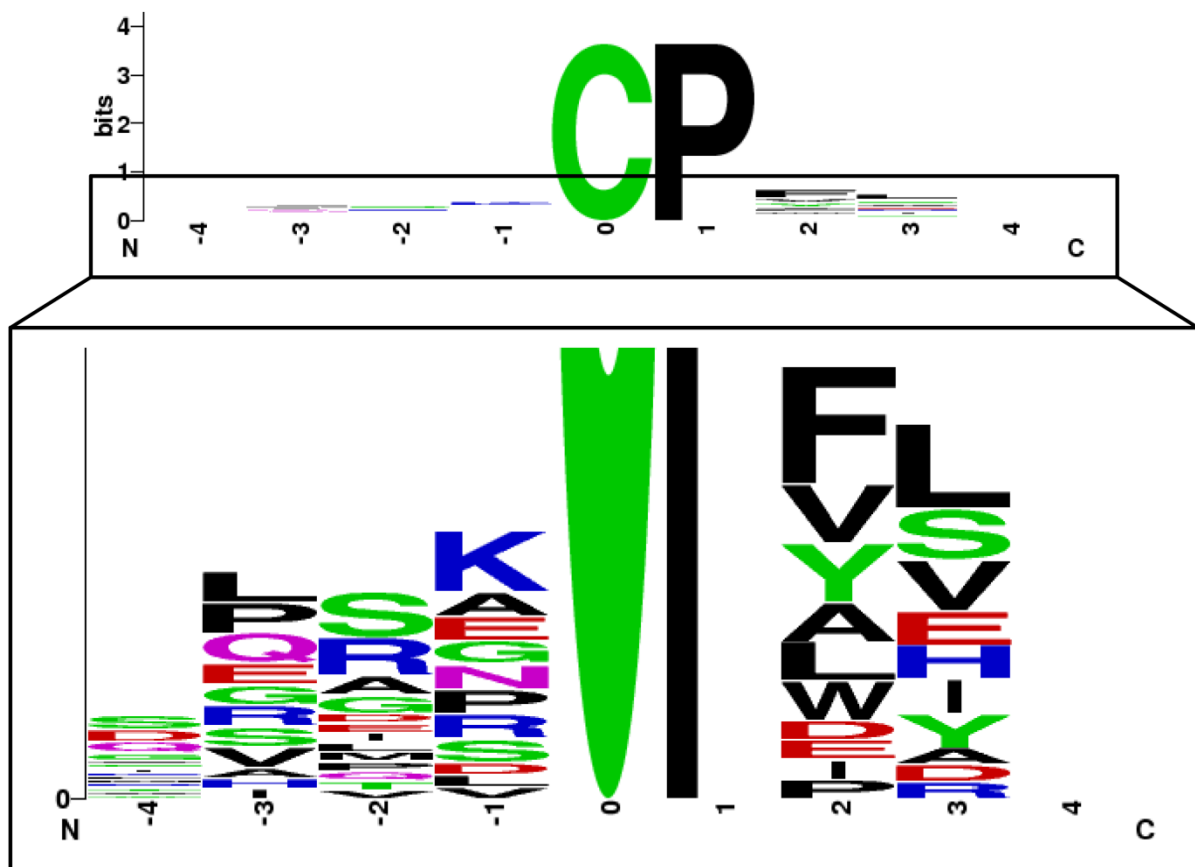


Abb. 20: Auftretenswahrscheinlichkeit/Konservierung einer Aminosäure an einer spezifischen Position aus einem Datensatz aller literaturbeschriebenen CP-Motive. Erstellt nach [141].

An Hand der Daten aus Abb. 20 lässt sich durch Gruppierung ähnlicher Aminosäuren mit vergleichbarer Polarität, Hydrophilie und/oder Ladung in den jeweiligen Positionen eine allgemeine Konsensussequenz der Form [STDENQ]-[SEQLV]-[STRAG]-[KRAG]-C-P-[FVYALI]-[LSVIYDE]-X für CP-Motive ableiten. Die Validität dieser Konsensussequenz konnte, wie nachfolgend beschrieben, mit Hilfe des Screenings einer Peptidbibliothek in einem praktisch durchgeführten Ansatz abgeglichen werden.

Der Einsatz von Peptiden zur Untersuchung Häm-regulierter Motive hat sich bereits mehrfach als zielführend erwiesen. [4, 55, 127, 128, 131, 132] Darüber hinaus war es sogar möglich, die Funktion Häm-bindender Proteine durch Reduktion der Proteinsequenz auf kurze peptidische Sequenzen zu imitieren, wie z. B. für Katalase beschrieben. [108] Die Tatsache, dass hydrophobe und elektrostatische Interaktionen mit dem Protoporphyrin IX, sowie Packungseffekte und Wasserstoffbrückenbindungen von benachbarten Aminosäuren

des axialen Liganden beigesteuert werden (vgl. Kapitel 2.4), unterstützt die Anwendbarkeit von Peptiden zur Modellierung Häm-regulierter Motive zusätzlich.

An Hand bekannter Motive aus HBMs und HRMs (vgl. Kapitel 2.4.2 und 2.4.3) sowie angelehnt an die Untersuchungen von Li *et al.* [112] wurde die Peptidbibliothek mit der allgemeinen Sequenz XXXX[C/H/Y]XXXX (X = 18 proteinogene Aminosäuren außer Cys und Met, inkl. Norleucin) zur Untersuchung der Einflüsse umgebender Aminosäuren konstruiert. Dabei werden Vertreter wie das CXXCH-Motiv aus hSlo1 bzw. Cytochrom c nicht berücksichtigt, um zunächst ausschließlich den Effekt nichtkovalenter Interaktionen mit dem Hämin zu betrachten. Außerdem sollte der Einfluss von Thiol-Disulfid-Schaltermechanismen außer Acht gelassen werden, da das Vorhandensein mehrerer Cysteine in einer Sequenz gegebenenfalls zur Ausbildung von Disulfidbrücken führen kann, die die Interaktion mit Hämin signifikant beeinflussen. [66, 91]

Es wurde mittels Festphasenpeptidsynthese eine "One-bead-one-compound"-Bibliothek hergestellt, bei der das jeweilige Peptid über einen flexiblen Linker (BBBBRM, B - β -Alanin) an das Syntheseharz verbunden war. Da dieser Linker zur anschließenden Analytik der Sequenzen an den Beads mit Bromcyan gespalten wurde, musste auf die Verwendung von Methionin in der allgemeinen Sequenz XXXX[C/H/Y]XXXX verzichtet werden. Als isosterer Ersatz wurde Norleucin verwendet. [134, 142] Für die Analytik wurde zusätzlich die Sequenz N-terminal um 2 Alanine verlängert, so dass die hergestellte Peptidbibliothek die folgende Sequenz enthielt: AAXXXX[C/H/Y]XXXXBBBBRM-Harz. [136]

Als Interaktionspartner für die synthetisierte Bibliothek wurde Hämin appliziert, das bereits mehrfach für Untersuchungen an Häm-regulierten Proteinen zum Nachweis der Bindung an diese verwendet wurde (vgl. Kapitel 2.4.3.1, 2.4.3.2, 2.4.3.3). Es finden sich darüber hinaus einige Vertreter der permanent Häm-bindenden Proteine (u. a. Cytochrom-P450-Proteine, Peroxidasen), die ebenfalls Fe^{III} als Zentralion tragen (vgl. Kapitel 2.4.2.1, 2.4.2.2). Ishikawa *et al.* schlussfolgerten sogar, dass Fe^{III} -Häm im Allgemeinen als Signalmolekül in Zellen für die Erkennung durch HRMs fungiert. [54]

Inkubation von Hämin mit der beschriebenen Peptidbibliothek führte zur selektiven Bindung des Liganden an ausgewählte Beads. Die Detektion erfolgte über die Färbung der sonst farblosen Beads, die nach Häminbindung eine gelbgrüne Farbe annahmen. Beads, die keine Interaktion mit Hämin aufwiesen, blieben hingegen farblos (Abb. 21). [136] Der Vorteil der direkten Färbung der Beads durch Bindung des chromophoren Hämins lag in der einfachen Durchführung, die eine nachgeschaltete Sichtbarmachung, wie sie für die meisten Untersuchungen an One-bead-one-compound-Bibliotheken üblich ist, obsolet gemacht hat. [134, 142-145] Gefärbte Beads wurden anschließend manuell unter einem Stereomikroskop selektiert und hinsichtlich ihrer Peptidsequenz analysiert.

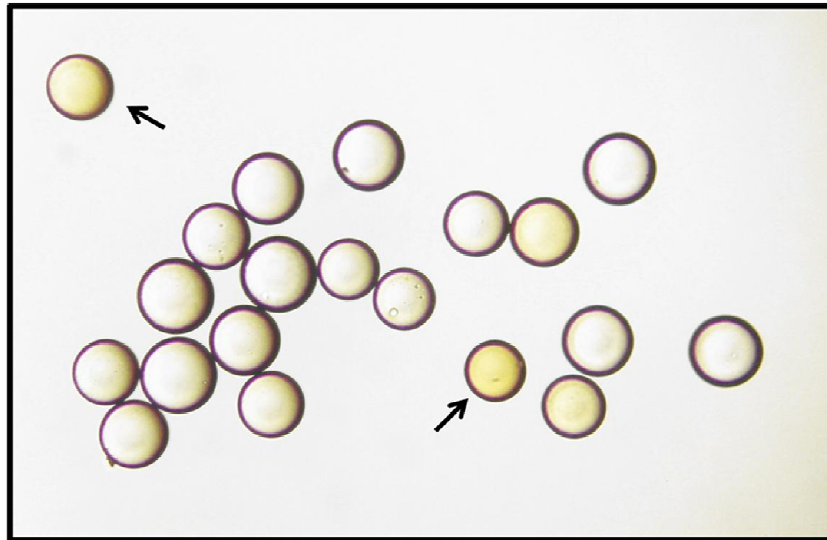


Abb. 21: Mikroskopische Aufnahme der Inkubation von Häm (10 nM) mit Polymerpartikeln der Peptidbibliothek nach 4 Stunden. Mit Pfeilen markierte Beads zeigen eine sichtbare, gelbe Färbung im Vergleich zu den umliegenden Beads, die die selektive Bindung des chromophoren Häms widerspiegelt. [136]

5.1.2 Identifikation Häm-assoziiierter Sequenzen: Klassische Edman-Sequenzierung versus PED-MS-Methode

Für die Analyse gefärbter Beads wurden zwei Verfahren zur Identifizierung der mit Häm interagierenden Peptidsequenz angewendet. Das Standardverfahren zur Bestimmung der unmittelbaren Aufeinanderfolge von Aminosäuren stellt der Edman-Abbau dar. Das sogenannte "On-bead sequencing", der Edman-Abbau unmittelbar am Harzbead, liefert dabei sehr zuverlässige, gut aufgelöste Ergebnisse für jeden einzelnen Schritt der Sequenzierung (Abb. 22A). [143, 144] Unter Berücksichtigung des Kostenfaktors ist jedoch ein günstigeres Verfahren notwendig um ein umfangreicheres Datenvolumen zur Auswertung der Bindungsspezifitäten zu generieren. Diese Alternative stellt der mit Massenspektrometrie gekoppelte partielle Edman-Abbau (PED-MS) dar. [134] Über zyklische Abspaltung der einzelnen Aminosäuren in Konkurrenz mit Capping-Reaktionen, die einen weiteren Abbau der Peptidketten zu einem gewissen Prozentsatz verhindern, wird auf diesem Weg eine Peptidleiter generiert. Mit deren Hilfe kann nach Abspaltung vom Harz mittels Massenspektrometrie durch Ermittlung der Massedifferenzen zwischen einzelnen Peaks die Sequenz des Peptids bestimmt werden (Abb. 22B). Wichtigster Orientierungspunkt für die Auswertung ist dabei der zweimal auftretende Abstand von 71 g/mol, repräsentativ für zwei Alaninreste, die den Startpunkt für die weiteren Berechnungen einer Sequenz repräsentieren. [134, 142, 146] Auf dieser Basis kann eine vollständige Sequenz ermittelt werden, wenn die Auflösung der Massenspektren ausreichend genau war. Das Auftreten von nicht eindeutigen Positionen ist bei dieser

Methodik ein weiteres Problem, dass nicht vollständig ausgeschlossen werden kann. [146] In der weiteren Auswertung kann dieser Effekt so schwerwiegend werden, dass es dadurch bis zum Abbruch der Sequenzbestimmung für die jeweilige Sequenz führen kann. Darüber hinaus sind auch Fragmentierungsreaktionen im Verlauf der Ionisierung nicht vollständig auszuschließen, die diese Auswertung erschweren. Diese Methode ist damit gegenüber der "On-bead-Sequenzierung" anfälliger für Fehlsequenzen, zeigt jedoch höheres Potential in Bezug auf Durchsatzraten auf Grund der schnellen und kostengünstigen Durchführbarkeit.

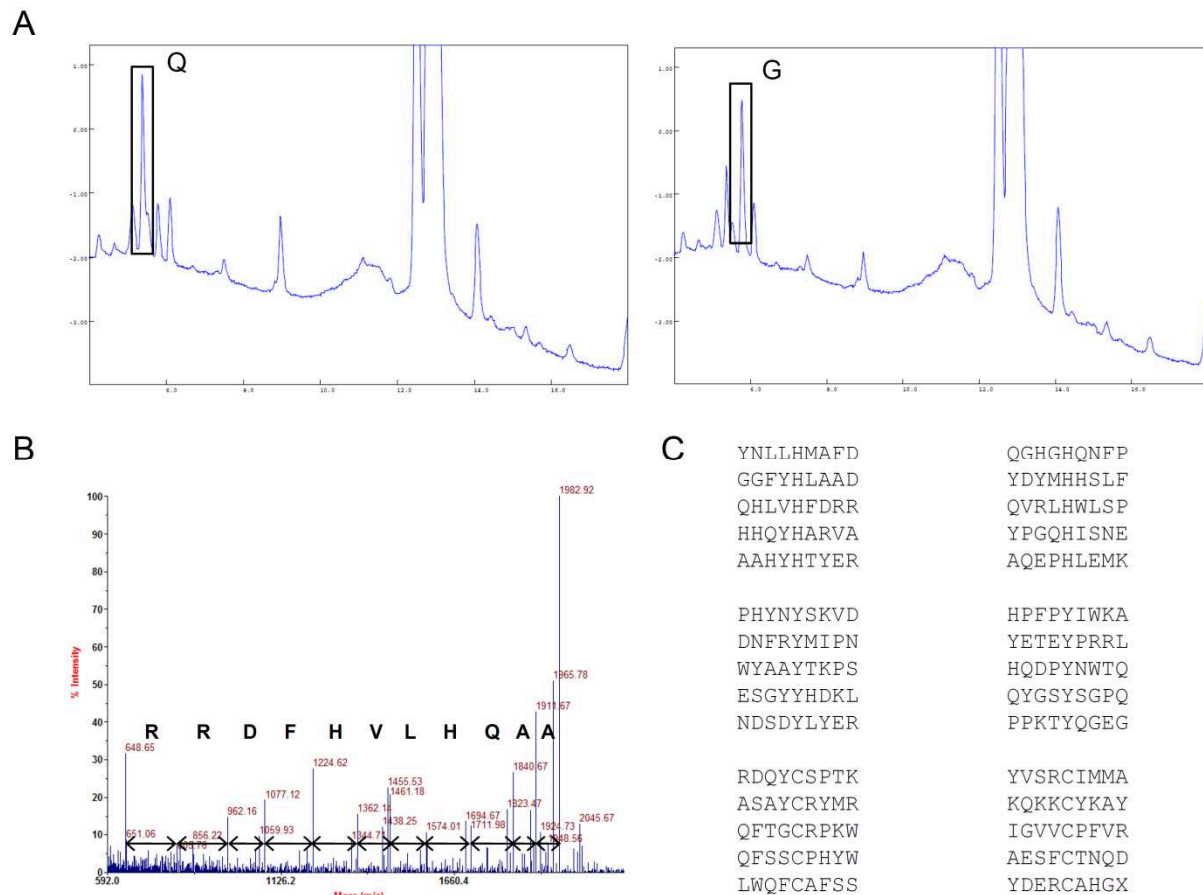


Abb. 22: (A) On-bead-Sequenzierung eines Hämin-bindenden Peptid-enthaltenden Partikels mit der Sequenz AAPPKTYQGEG-Linker-Harz. Dargestellt sind repräsentativ der 8. und der 9. Zyklus der Sequenzierung, die das deutliche Auftreten eines neuen Peaks (Rahmen) im jeweiligen Zyklus aufweisen. (B) Massenspektrum eines mit partiellem Edman-Abbau analysierten, Häm-bindenden Beads mit der Sequenz AAQHLVHFDRR-Linker-Harz. Massedifferenzen der Peptideiter geben Rückschlüsse auf die jeweilige Aminosäure. (C) Auswahl ermittelter Sequenzen mittels beider Analytikmethoden. Linke Spalte: ermittelte Sequenz mittels PED-MS, rechte Spalte: ermittelte Sequenzen mittels On-bead-Sequenzierung. (M, Norleucin). [136]

Mit Hilfe beider Methoden ließ sich insgesamt ein Datensatz aus 210 Sequenzen (180 über PED-MS, 30 über "On-bead-Sequenzierung") erzeugen, die im nächsten Kapitel genauer charakterisiert werden sollen. Ein repräsentativer Auszug ermittelter Sequenzen ist in Abbildung 22C dargestellt. [136]

5.1.3 Spezifität der Häminbindung

Der Einfluss des axialen Liganden spielt bei der Bindung von Häm b eine entscheidende Rolle für die Funktionalität des Komplexes. [112, 114] Damit ergibt sich auch ein entscheidender Bindungsbeitrag für Häm b bzw. Hämin als axialer Ligand, der sich primär auf die Aminosäuren Histidin, Tyrosin, Cystein und Methionin erstreckt. [112] Histidin ist in einem Datensatz aus nicht-redundanten Proteinen prominentester Vertreter, während Cystein gefolgt von Methionin und Tyrosin deutlich weniger häufig als axialer Ligand des Häm b auftreten (Abb. 23A). [112] Die Verteilung dieser Aminosäuren durch Anwendung von Hämin während des Screenings konnte unter Ausschluss von Methionin aus den in Kapitel 5.1.1 genannten Gründen für Histidin (38,4%) und Cystein (21,2%) bestätigt werden (Abb. 23B). Dennoch war bereits hier eine deutliche Erhöhung an Cystein gegenüber Histidin erkennbar. Am auffälligsten war der sehr hohe Anteil Tyrosin-basierter Sequenzen (40,4%) (Abb. 23B). Unter Berücksichtigung des in Kapitel 2.4 angesprochenen HSAB-Prinzips ist jedoch gut nachvollziehbar, dass bei Einsatz von Hämin statt Häm harte Liganden wie Tyrosin deutlich besser an das harte Hämin (Fe^{III}) binden können als an das weichere Häm (Fe^{II}). Bei dieser Auswertung wurde davon ausgegangen, dass die zentrale Aminosäure in der Sequenz XXXX[C/H/Y]XXXX den axialen Liganden stellen würde.

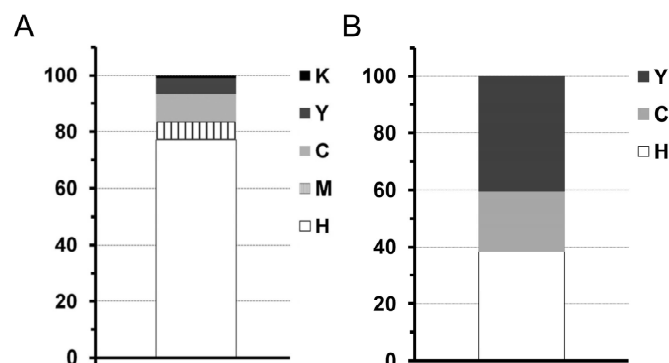


Abb. 23: Verteilung der axialen Liganden (A) in einem Datensatz aus 198 Liganden für Häm b [112] und (B) für Hämin aus einem Screening einer Peptidbibliothek mit der Sequenz XXXX[C/H/Y]XXXX (X = 18 proteinogene Aminosäuren ohne Cys und Met, inkl. Norleucin). [136]

Auf der Grundlage, dass die jeweiligen axialen Liganden ein unterschiedliches Umfeld der Aminosäuren präferieren (vgl. Kapitel 2.4.2) [112], wurde zunächst auf der Basis jeder einzelnen axialen Aminosäure der Peptidbibliothek die Verteilung der anderen Aminosäuren auf einer definierten Position berechnet (mit [C/H/Y] als Position 0) (Tab. 4).

Tab. 4: Verteilung von Aminosäuren an Hand der erhaltenen Daten des Screenings der Peptidbibliothek AAXXXX[C/H/Y]XXXX-Linker mit Häm in unter der Annahme, dass die zentrale Aminosäure [C/H/Y] (Position 0) das Fe^{III}-Ion koordiniert. Relativ dazu wurden die anderen Position gezählt. Modifiziert nach [136].

-4	-3	-2	-1	0	1	2	3	4
<u>Cys an Position 0</u>								
A (1.6) [*]	D (1.3)	S (1.9)	F (1.2)	C	S (1.2)	H (1.8)	M (1.4)	W (1.5)
Q (1.6)	D/E/Q	S/T (2.3)	F/W/Y		T (1.2)	H/I/L/M/	F (1.0)	W/Y
E/Q (2.0)	(2.5)	A (1.2)	(2.7)		S/T/Y	V (3.9)	Y (1.0)	(2.0)
F/W/Y	F (1.7)	A/G (1.9)	R (1.2)		(3.1)	N (1.4)	F/M/Y	D (1.5)
(2.4)	F/W/Y	K (1.2)	H/K/R		R (1.2)	Q/N (1.8)	(3.3)	D/N (2.0)
F/I/L	(3.3)		(2.3)		H/K/R	S (1.2)	S (1.0)	H (1.0)
(2.4)	F/M/Y		D/Q/N		(2.3)	S/T/Y	T (1.0)	K (1.0)
	(2.9)		(2.3)		P (1.2)	(1.8)	S/T/Y	H/K/R
			A/G (1.2)		A/G (1.2)	F (1.2)	(2.9)	(2.5)
						P (1.2)	D (1.0)	A (1.0)
							Q (1.0)	A/G (1.5)
							D/N/Q	S (1.0)
							(2.4)	
<u>His an Position 0</u>								
Y (1.2) ^[a]	N (1.2)	R (1.2)	Y (1.1)	H	A (1.2)	D (1.2)	M (1.5)	A (2.0)
S/T/Y	D (1.0)	H/K/R	S/T/Y		A/G (1.7)	N (1.2)	V (1.1)	A/G (2.7)
(2.3)	D/N/Q	(2.6)	(1.9)		W (1.0)	D/E/N	F/M/V	D (1.7)
K (1.2)	(2.9)	Q (1.0)	H/I/L/M/		F/W/Y	(3.2)	(3.3)	E (1.3)
H/K/R	H(1.0)	D/E/N/Q	V (2.8)		(2.2)	S/T/Y	F/I/L/M/	D/E (3.0)
(2.1)	H/K/R	(2.8)			K (1.0)	(2.1)	V (4.1)	F (1.0)
A/G (1.3)	(2.4)	Y (1.0)			H/K/R		S (1.1)	
	H/I/L/M/	A/G (1.2)			(2.2)			
	V (2.5)				H/I/L/M/			
	A/G (1.2)				V (2.4)			
<u>Tyr an Position 0</u>								
E (1.3)	L (1.2)	R (1.2)	A (1.3)	Y	S (1.1)	K (1.2)	E (1.3)	D (1.5)
D/E/N/Q	H/L/M/V	H/K/R	A/G (1.5)		S/T/Y	H/K/R	P (1.3)	Q (1.2)
(3.0)	(2.4)	(2.4)	N (1.3)		(2.3)	(2.4)	H (1.0)	D/E/N/Q
H (1.1)	Y (1.0)	F (1.2)	P (1.3)		F (1.1)	E (1.0)	R (1.0)	(3.2)
H/I/L/M/	S/T/Y	S (1.0)	D (1.1)		D/N (1.7)	E/Q (1.7)	H/K/R	R (1.5)
V (3.0)	(2.2)	S/T/Y	D/N (2.5)			A/G (1.5)	(2.6)	H/K/R
S/T/Y	D (1.0)	(2.2)	S/T/Y				G (1.0)	(2.6)
(1.9)	D/E/Q/N	A/G (1.4)	(2.1)				A/G (1.6)	A/G (1.8)
	(2.2)							
	A/G (1.2)							

^[a]Aminosäuren, die mit mehr als 10% in der Gesamtheit aller Sequenzen an der jeweiligen Position auftraten (z. B. 1.6 = 16%). M, Norleucin.

In Abhängigkeit von der zentralen Aminosäure findet man in der Umgebung verschiedene bevorzugte Vertreter. Das ist in Übereinstimmung mit den bisherigen Befunden, die die Umgebung in einer Häm-bindenden Sequenz untersuchten. [106, 112] In einigen Positionen waren dabei die Präferenzen für eine definierte Aminosäure relativ gering. Diese bildete jedoch mit anderen Aminosäuren ähnlichen Charakters eine größere Gruppe, die daraufhin eine stärkere Repräsentation zeigte (z. B. Cys-basierte Sequenzen Position +1 für die

polaren Aminosäuren Ser/Thr/Tyr). Aus Konservierungsstudien wurde analog hierzu bestätigt, dass einzelne Aminosäuren seltener konserviert sind, während die Erhaltung des Charakters einer Aminosäure den Regelfall für eine Häm-bindende Sequenz darstellte. [106] Im Allgemeinen kann man aus den erhaltenen Ergebnissen des Screenings zusammenfassen, dass für alle Sequenzen einzelne Aminosäuren besonders häufig auftraten (N-terminal: Ala, Gly, Phe, Tyr, Lys, Arg, Glu, Asp, Gln; C-terminal: Ala, Val, Phe, Ser, Lys, Arg, Asp, Asn), während andere Aminosäuren seltener vorkamen (N-terminal: Norleucin, Ile, C-terminal: Ile, Leu, Trp). Darüber hinaus konnte man für alle drei koordinierenden Aminosäuren finden, dass polare und geladene Aminosäuren auf beiden Seiten von Position 0 präferiert werden. Dennoch ließen sich auch signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen feststellen. His- und Tyr-basierte Sequenzen wiesen die Aminosäuren His, Leu, Thr und Asn im N-Terminus deutlich häufiger auf als Cys-basierte. Man konnte im Speziellen für Cys-basierte Sequenzen einen Überschuss an Pro im C-terminalen Bereich finden, der vor allem an den Position +1 und +2 prominent war, während Glu im C-Terminus dieser Peptide vollkommen fehlte. Auch Tyr-basierte Sequenzen wiesen einen hohen Anteil an Pro auf. Die Verteilung der Aminosäuren in His-basierten Sequenzen wies Präferenzen im N-Terminus für Tyr > Glu/Asp/Gln/Asn > Arg/Lys/His > Leu/Ala/Gly und im C-Terminus für Ala > Glu/Asp/Gln/Asn > Arg/Lys auf. Die jeweils charakteristischen Aminosäuren spiegeln sich in typischen Beispielsequenzen wieder, die aufgeteilt nach N- und C-Terminus der Peptide die erwähnten Eigenschaften besitzen und im Folgenden aufgezählt sein sollen:

1. N-Terminus

- a. Cys-basierte Sequenzen: RDQY, AESF, KQKK, YDER
- b. His-basierte Sequenzen: YNLL, QGHG, AAHY, QVRL, HHQY
- c. Tyr-basierte Sequenzen: PHYN, HQDP, DNFR, QYGS, NDSD, HPFP

2. C-Terminus

- a. Cys-basierte Sequenzen: PFVR, SPTK, TNQD, RYMR
- b. His-basierte Sequenzen: ARVA, LAAD, MAFD, FDRR
- c. Tyr-basierte Sequenzen: PRRL, QGEG, LYER, HDKL

Es lässt sich aber auch erkennen, dass die ermittelten Spezifitäten an den jeweiligen Positionen häufig mehrere Aminosäuren zum Teil auch unterschiedlichen Charakters aufweisen (z. B. Cys-basierte Sequenzen, Position P-1). Außerdem beobachtet man das Auftreten weiterer axialer Liganden für Häm in einer Sequenz in 55,6% aller analysierten Beads. Dabei besaßen ca. 18,5% aller Peptide ein weiteres Histidin und 23,2% aller Peptide ein weiteres Tyrosin, während die restlichen 13,9% sogar mehr als ein Histidin und/oder Tyrosin aufzeigten. [136] Diese Ergebnisse deuteten darauf hin, dass die vereinfachte Aufteilung nach potentiell axialen Liganden (Cys/His/Tyr) nicht ausreichend ist. Es ist zu

vermuten, dass mehrere Klassen mit der aktuellen Aufteilung zusammengefasst sind. Daher wurde für weitere Untersuchungen eine noch weitere Unterteilung auf der Basis des Auftretens oder Nicht-Auftretens weiterer Häm-in-koordinierender Aminosäuren als Ausgangspunkt für eine vorgeschlagene Klassifizierung der Bindung an kurze Sequenzmotive/HRMs angenommen (Abb. 24). [136]

Ergänzend wurden die CP-Motive in der Klassifizierung in Abbildung 24 berücksichtigt, die sich aber auch in den Daten des Screenings widerspiegeln, in denen Prolin mit 12% aller Cys-basierten Motive an Position +1 auftritt. Andere HRMs wurden entweder nicht durch die untersuchte Peptidbibliothek abgedeckt (z. B. CXXCH aus hSlo1) oder besaßen bisher zu wenig Vertreter zur Verallgemeinerung (z. B. CXXH aus Kv1.4). Daher waren weitere Unterteilungen bisher nicht offensichtlich und wurden unberücksichtigt gelassen.

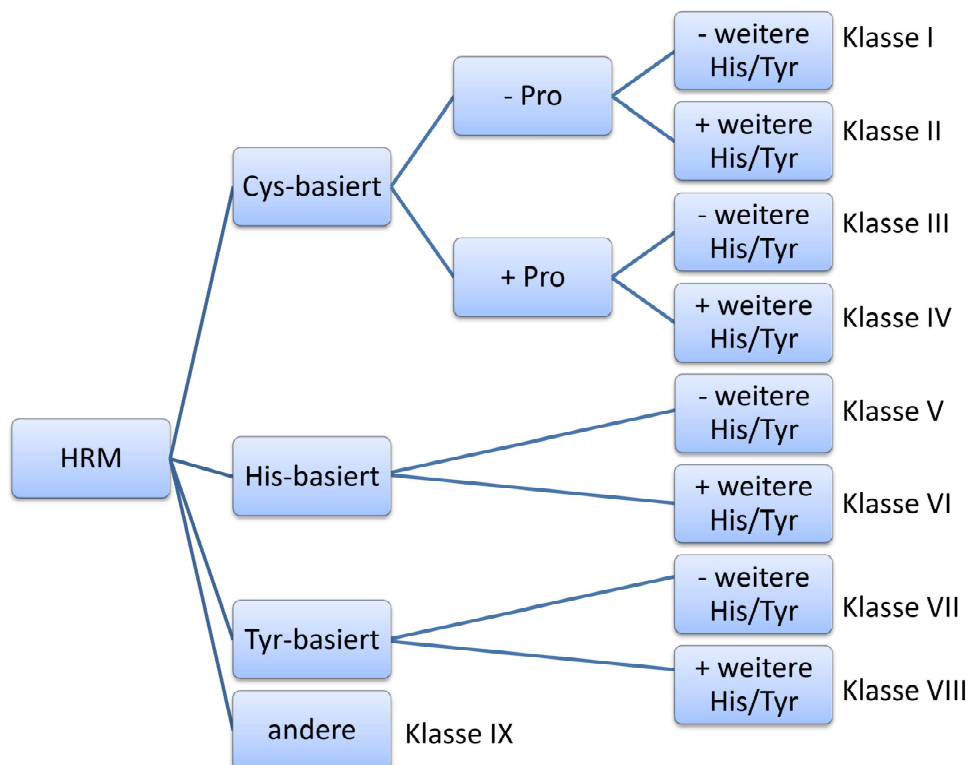


Abb. 24: Klassifizierung der Häm-bindung an Peptide, repräsentativ für kurze Sequenzabschnitte in Proteinen (HRMs) nach dem Auftreten von Häm-koordinierenden Aminosäuren.

Beim Abgleich der erhaltenen Daten mit bisher bekannten HRMs fällt auf, dass es zahlreiche Übereinstimmungen gibt, die die Validität der ermittelten Ergebnisse des Screenings der Peptidbibliothek untermauern. Die erhaltene Konsensussequenz [STDENQ]-[SEQLV]-[STRAG]-[KRAQ]-C-P-[FVYALI]-[LSVIYDE]-X aus der Untersuchung bekannter CP-Motive (vgl. Kapitel 5.1.1) deckt sich in zahlreichen Fällen mit den experimentell erhaltenen Daten in den einzelnen Positionen (Tab. 4). Sogar für HBMs wie das Katalase-Motiv oder das

Peroxidase-Motiv (vgl. Kapitel 2.4.2.2) finden sich Übereinstimmungen zu den Ergebnissen aus dem Screening der kombinatorischen Peptidbibliothek. Beim Vergleich der erhaltenen Daten mit den in Kapitel 2.4 erwähnten Präferenzen [106, 111, 112] bestätigte sich auf den ersten Blick der hohe Anteil basischer und vor allem hydrophober, sowie aromatischer Aminosäuren im Bereich von Position -2 bis +2. Bei weiterer Betrachtung fällt jedoch auf, dass mit steigender Entfernung von der zentralen Aminosäure auch saure oder polare Aminosäuren vorkommen. Inwiefern ihr Einfluss tatsächlich für die Hämbindung relevant ist, ist vor allem bei den sauren Aminosäuren Glu und Asp unklar, da diese normalerweise Abstoßungseffekte zu den Propionatseitenketten aufweisen, die die Bindung von Häm in verhindern würden. [114] Denkbar wären jedoch Effekte, die die Struktur des Peptids zur Bindung des Hämins stabilisieren würden (z. B. intermolekulare Salzbrücken zu basischen Aminosäuren). Für die polaren Aminosäuren sind Wasserstoffbrückenbindungen zu den Propionatseitenketten oder zum axialen Liganden zur Stabilisierung der Hämbindung denkbar. Um solche Effekte jedoch genauer beschreiben zu können, sind Untersuchungen an ausgewählten Repräsentanten notwendig, die die Bindung von Häm quantifizieren sowie die Struktur des entstehenden Komplexes abbilden. Daraus können detaillierte Ableitungen über die Einflüsse einzelner Aminosäuren gemacht und klassifiziert werden. Derartige Untersuchungen werden im nachfolgenden Kapitel in einem ersten Ansatz für verschiedene Vertreter Cys-, His- und Tyr-basierter Peptide im Allgemeinen und im Speziellen für Cys-basierte Peptide vertieft in Kapitel 5.2 durchgeführt.

Somit können die Aussagen aus dem Screening der Peptidbibliothek die Identifikation potentiell neuer HRMs aus bisher für die Regulation durch Häm/Hämin unbekannten Proteinen stimulieren. Außerdem können sie unterstützend für Untersuchungen zu HRMs an Proteinen genutzt werden, für die eine Häm-/Häminbindung bekannt ist aber keine genaue Bindestelle beschrieben wurde. Eine solche Anwendung ist in den Kapitel 5.1.5 und besonders 5.3 weiterführend dargestellt.

5.1.4 Häminbindekapazität ausgewählter Peptide

Charakteristische Kenngrößen, die bei der Ermittlung der Häm-/Häminbindekapazität bestimmt werden können, sind bei funktionalen Proteinen IC_{50} -Werte, aber auch Geschwindigkeits- und Dissoziationskonstanten. [25, 53, 59, 66, 70, 91, 131, 147] Darüber hinaus wurden auch aus den Proteinen abgeleitete Peptide zur Bestimmung der Bindekapazität von Häm/Hämin verwendet. [55, 91, 128, 131] Eine klassische Methode zur Bestimmung von Dissoziationskonstanten (K_D) von zwei miteinander interagierenden Komponenten, ein sich änderndes Absorptionsverhalten vorausgesetzt, ist die UV/Vis-Spektroskopie. [25, 55, 66, 70, 91, 128, 135]

Zur Erarbeitung der Messparameter und Überprüfung der Anwendbarkeit dieses Ansatzes wurde eine UV/Vis-Messung des literaturbeschriebenen Peptids HBP23 (heme binding peptide, 23 Aminosäurereste) aus hSlo1 durchgeführt (Abb. 25). [53, 91, 148] Die Anpassung der Auftragung der Absorptionen der Differenzspektren gegen die eingesetzten Häminkonzentrationen ergab dabei einen K_D -Wert von $0,72 \pm 0,46 \mu\text{M}$. Dieser ist vergleichbar mit der bisher beschriebenen Dissoziationskonstante von $0,21 \mu\text{M}$ für die reduzierte Form des Peptids. [91] Das oxidierte HBP23 hingegen besaß einen K_D -Wert von $14,5 \mu\text{M}$, der um ca. einen Faktor 20 größer ist als der ermittelte. [91] Daher kann geschlossen werden, dass die verwendeten Messbedingungen geeignet waren, um zuverlässig Ergebnisse zu produzieren, die u. a. Nebenreaktionen wie die Oxidation von Cysteinen ausschließen.

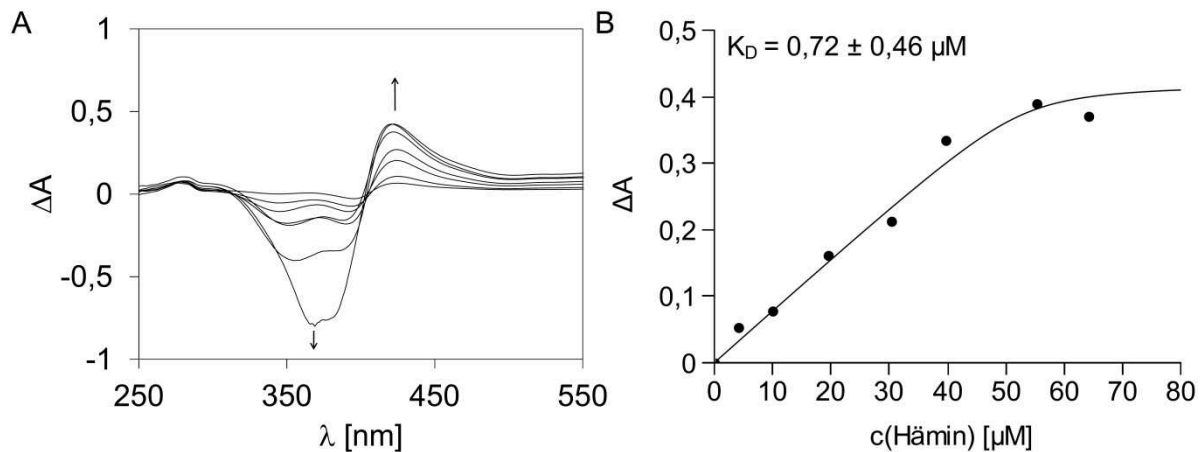


Abb. 25: (A) Differenzabsorptionsspektren von HBP23 mit Häm in Abhängigkeit vom Häm:Peptid-Verhältnis. Die Intensität der Soret-Bande des Komplexes bei 415 nm steigt mit größer werdenden Häminkonzentrationen und ermöglicht die Berechnung der Dissoziationskonstante des Peptid-Häm-Komplexes (B). [136]

Im Rahmen der Untersuchungen Häm-regulierter Proteine wurde bereits der Einsatz von kurzen Peptiden mit bis zu fünf Aminosäuren beschrieben, für die eine Bindung an Häm nachgewiesen werden konnten. [55, 127, 128, 131, 132, 136, 148] Typisch sind jedoch Sequenzlängen zwischen neun und zehn Aminosäuren, wie sie auch für bioinformatische Studien an HRMs und HBMs Berücksichtigung fanden. [112]

Zur Beurteilung der Ergebnisse aus dem Screening der Peptidbibliothek wurden deshalb ausgewählte Nonapeptide der Cys-, His- und Tyr-basierten Sequenzen mittels UV/Vis-Spektroskopie untersucht (Abb. 26, Tab. 5). Damit sollten u. a. sterische Effekte durch die Bindung des Peptids ans Bead ausgeschlossen werden, die ansonsten die Peptidkonformation oder die Bindung des Hämins an das Peptid beeinflussen können.

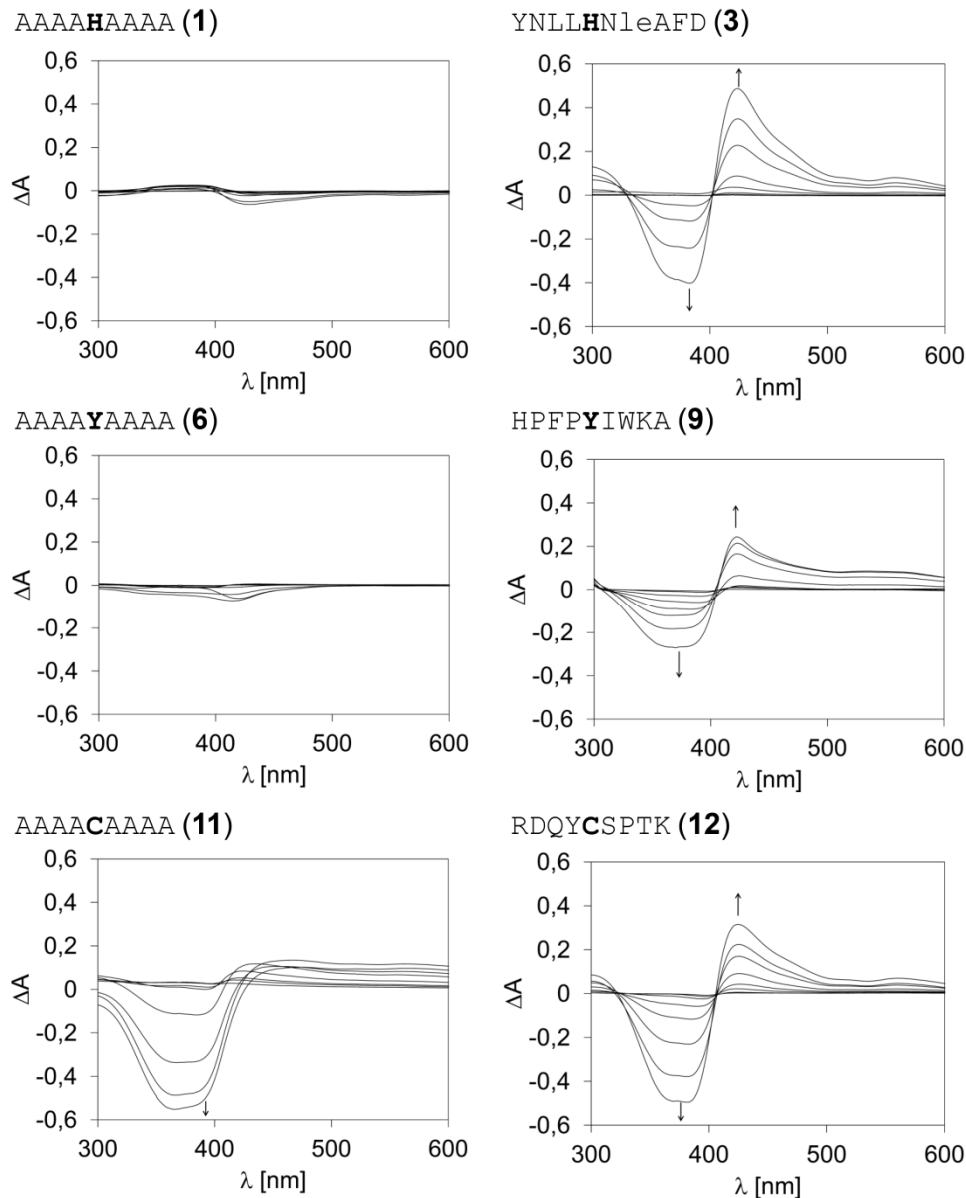


Abb. 26: Differenzabsorptionsspektren von ausgewählten Nonapeptiden mit Häm in Abhängigkeit vom Häm:Peptid-Verhältnis. Die Peptide **1**, **6** und **11** repräsentieren im Vergleich zu den Peptiden **3**, **9** und **12** Sequenzen (Negativkontrollen), die in Folge der Bindung von Häm eine keine signifikante Verschiebung der Soret-Bande und einen damit verbundenen Anstieg des Absorptionsmaximums aufweisen. [136]

Für die durchgeführten UV/Vis-Messungen wurden zunächst 17 Peptide ausgewählt, für die K_D -Werte zur Ermittlung der Häm bindekapazität bestimmt wurden. Drei bis vier Peptide wurden dabei für jede Eisen-kordinierende Aminosäure als Repräsentanten aus den Ergebnissen des Screenings der Peptidbibliothek gewählt. Als Negativkontrollen wurden all-Ala-Peptide verwendet, die sich ausschließlich in der zentralen Aminosäure an Position 0 (Cys/His/Tyr) unterschieden (Peptide **1**, **6**, **11**). Zum Vergleich wurden Positivkontrollen synthetisiert, die aus Proteinen abgeleitet wurden, für die die Bindung an ein HRM bereits nachgewiesen werden konnte.

Tab. 5: Charakterisierung der Häminbindung an ausgewählte Peptide. [136]

Nr.	Peptidsequenz ^[a]	Herkunft [Referenz]	K _D [μM]	Häminbindekapazität ^[d]
1	AAAA H AAAA	Negativkontrolle	k.B. ^[b]	-
2	HHQY H ARVA	Screening	0,87 ± 0,05	+
3	YNLL H MAFD	Screening	k.S. ^[c]	+
4	YNEH H WHMA	Screening	k.S.	++
5	VFKE H PAFR	hEAG1, <i>H. sapiens</i> [90]	k.S.	-
6	AAAA Y AAAA	Negativkontrolle	k.B.	n.b. ^[e]
7	FLEN Y LYER	Screening	k.S.	n.b.
8	WYAA Y TKPS	Screening	k.S.	n.b.
9	HPFP Y IWKA	Screening	0,33 ± 0,25	++
10	RAFF Y CKAC	hSlo1, <i>H. sapiens</i> [53, 91]	0,28 ± 0,09	++
11	AAAA C AAAA	Negativkontrolle	k.B.	n.b.
12	RDQY C SPTK	Screening	k.S.	n.b.
13	QFSQ C RI MN	Screening	2,78 ± 0,78	n.b.
14	FYWD C NHYW	Screening	0,67 ± 0,12	n.b.
15	YVSR C IMMA	Screening	3,44 ± 0,64	n.b.
16	RADI C VHLN	hEAG1, <i>H. sapiens</i> [90]	0,40 ± 0,17	+
17	AFFY C KACH	hSlo1, <i>H. sapiens</i> [53, 91]	0,39 ± 0,09	n.b.

^[a]Alle Peptide wurden als C-terminale Amide synthetisiert. M, Norleucin. ^[b]k.B. und '-', keine Bindung. ^[c]k.S., keine Sättigung. ^[d]Die Auswertung der kompetitiven Bindungsstudien erfolgte wie folgt: '+' moderate Häminbindung, '++' starke Häminbindung. ^[e]n.b., nicht bestimmt.

Im Vergleich mit bekannten Hämin-bindenden Sequenzen, z. B. HBP23 aus hSlo1, erkennt man Ähnlichkeiten, aber auch Unterschiede zu den Spektren der untersuchten Nonapeptide (Abb. 26). Nur wenige Peptide zeigten ein komplett anderes Verhalten in Bezug auf die Bindung von Hämin (**2**, **11**) und/oder eine geringfügige bis gar keine Bindung (**1**, **6**). Für die meisten Peptide war eine bathochrome Verschiebung der Soret-Bande charakteristisch, wie für die Peptide **3**, **9** und **12** in Abbildung 26 dargestellt.

Die Bindung der Peptide konnte durch Bestimmung der Dissoziationskonstanten nach einem Modell der Bindung eines Liganden an ein Protein (1:1) quantifiziert und beurteilt werden. Zur Ermittlung dieser Konstanten wurden die Absorptionswerte des Maximums bei 420-430 nm und der dazugehörigen Häminkonzentration bestimmt. [91, 135] Die erhaltenen K_D-Werte sind in Tabelle 5 dargestellt. Während die Werte für die Bindung an verschiedene Häm-regulierte Proteine von pikomolaren (z. B. HRI) [147] bis zu mikromolaren Konzentrationen (z. B. HAP1) [55] variieren, liegt die Dissoziationskonstante für die meisten Peptid-Hämin-Interaktionen zwischen 0,1 und 10 μM. Während sich für die Negativkontrolle **1**, **6** und **11** keine Bindung mit Hämin zeigte, konnte für die Positivkontrollen **10** und **17** ein ähnlicher K_D-Wert wie für die längere Variante HBP23 (hSlo1) im hohen nanomolaren Bereich ermittelt werden (siehe oben). Dieser war vergleichbar zu anderen Literaturwerten. [91] Die Peptide **9** und **14** aus dem Screening der Peptidbibliothek zeigten ebenfalls vergleichbare Häminbindekapazitäten. Eine geringere Affinität im niedrigen mikromolaren

Bereich wurde für die Peptide **13** und **15** ermittelt. Eine weitere Gruppe von Peptiden (**3-5**, **7-8**, **12**) zeigte zwar in den UV/Vis-abgeleiteten Differenzspektren eine deutliche Verschiebung der Soret-Bande und damit Komplexbildung mit Häm, erreicht jedoch für die Bestimmung der Dissoziationskonstante keine Sättigung im Rahmen der gemessenen Häminkonzentrationen, wodurch keine K_D -Bestimmung möglich war.

In einem weiteren Ansatz sollte die Bindekapazität der Peptide in Kompetitionsstudien mit einem natürlichen Häm-regulierten Protein unter physiologischen Bedingungen analysiert werden. [136] Da als Positivkontrollen bereits verschiedene Peptide aus hSlo1 (**10**, **17**) eingesetzt wurden, eigneten sich daher Messungen am humanen Slo1-Kanal. Dazu wurde hSlo1 in *Xenopus*-Oozyten heterolog exprimiert und anschließend die Funktion des Kanals in einem Patch-clamp-Aufbau für Inside-out-Patches untersucht. [136] Es wurden an den jeweiligen Patches wiederholt 10-ms dauernde, depolarisierende Spannungssprünge auf 250 mV appliziert. Dabei handelte es sich um ein Membranpotential, das notwendig war, um den Kanal in Abwesenheit von Calcium-Ionen geöffnet zu halten. Anschließend konnte der Einfluss von 100 nM Häm untersucht werden, was innerhalb von 100 s zu einem beinahe vollständigen Verschluss des Kanals führte. [136] Dieser Effekt war reversibel, wobei der Prozess des Auswaschens in Übereinstimmung mit Literaturangaben langsam stattfand (Abb. 27A). [53] Für die nachfolgenden Kompetitionsexperimente wurden verschiedene Peptide mit unterschiedlichen Häm-bindekapazitäten ausgewählt. Als Negativkontrolle wurde das all-Ala-Peptid **1** aus den drei möglichen **1**, **6** und **11** ausgewählt, da es als His-basierte Sequenz das häufigste Auftreten in Bezug auf die Bereitstellung des axialen Liganden in der Natur widerspiegelte (Abb. 23) und die geringste Interaktion mit Häm in den UV/Vis-Messungen zeigte (Abb. 26). Die Peptide **3**, **4** und **5** wurden ebenfalls in die Messreihe aufgenommen, da sie die höchste Absorption bei vergleichbaren Häminkonzentrationen in den UV/Vis-Spektren zeigten. Außerdem wurden noch die höher affinen Peptide **2** und **9** sowie Peptid **10** als beste Positivkontrolle aus hSlo1 in die Kompetitionsstudien integriert. Die Ergebnisse der Messungen und die zu beobachtenden Effekte der vorinkubierten Häm-Peptid-Lösungen auf den Kanalverschluss sind in Abbildung 27B dargestellt. [136]

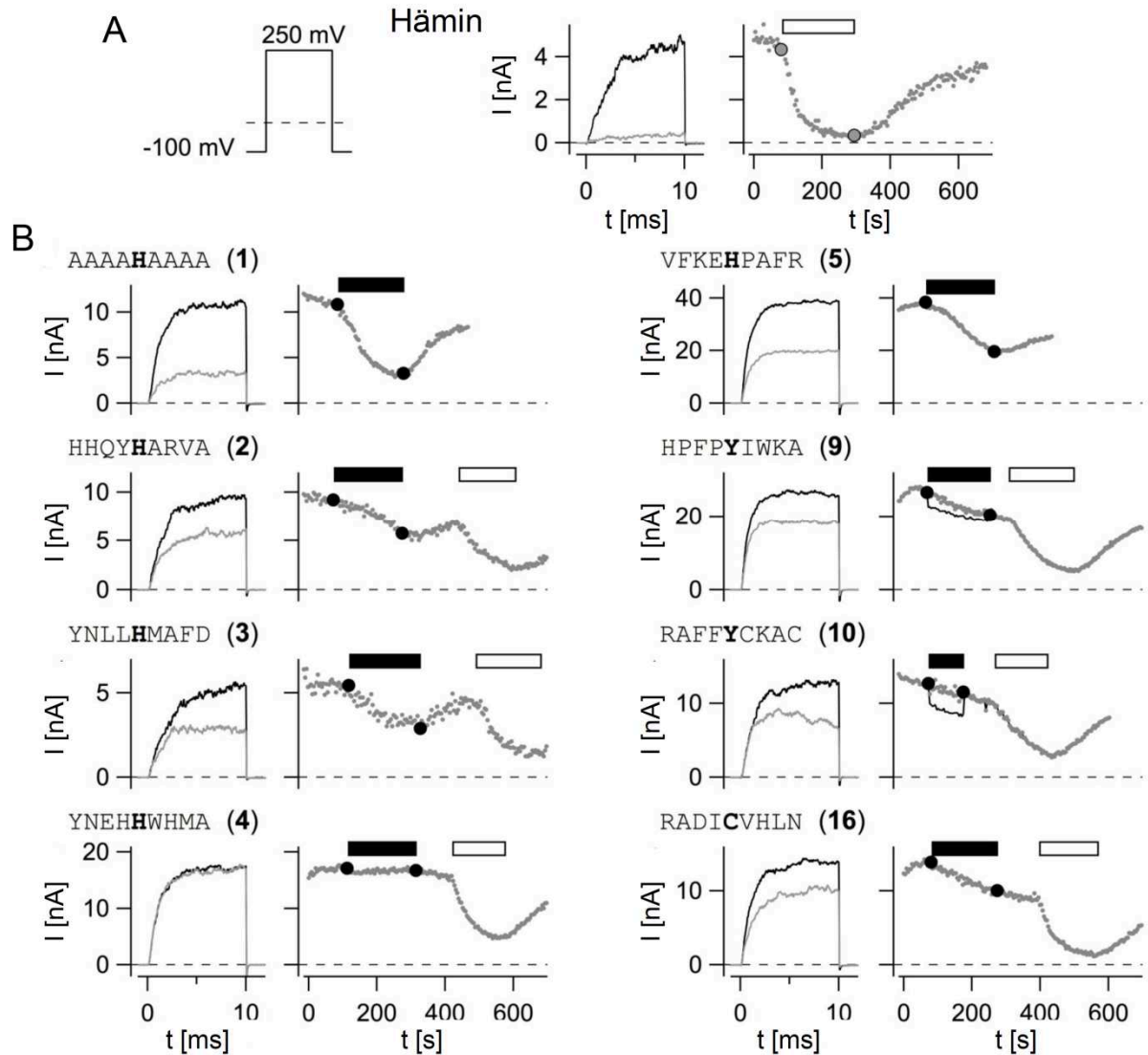


Abb. 27: Funktionelle Kompetitionssstudien mit hSlo1-Kanalproteinen (exprimiert in *Xenopus*-Oozyten). (A) Spannungsprofil (links) und Stromverläufe (Mitte) aufgenommen von Inside-out-Patches bei 250 mV vor (schwarz) und nach (grau) Applikation von 100 nM Hämin. (rechts) Der zeitabhängige Verlauf des maximalen Stromflusses bei 250 mV als Antwort auf die Applikation von Hämin (weißer Balken). Die großen Symbole stellen Datenpunkte aus der Auftragung der Stromverläufe (Mitte) dar. Zu beachten ist die langsame Wiederherstellung vom Hämin-induzierten Verschluss durch Auswaschen des Hämins. (B) (linke Spalte) Ähnliche Experimente wie in (A), aber die erste Applikation (schwarzer Balken) enthielt eine Mischung aus 100 nM Hämin und 1 μ M des jeweils dargestellten Peptids. Die Stromverläufe wurden vor (schwarz) und nach (grau) der Applikation dieser Mischung aufgenommen. (rechte Spalte) Zeitabhängiger Verlauf des maximalen Stromflusses bei 250 mV mit Markierung der Applikation der Hämin/Peptid-Mischung (100 nM/1 μ M, schwarzer Balken) und in einigen Fällen einer nachfolgenden zweiten Applikation von Hämin alleine (100 nM, weißer Balken). Spannungsamplituden wurden um den durch die Peptide 9 und 10 verursachten Verschluss des offenen Kanals korrigiert: die schwarzen Linien stellen die nicht korrigierten Daten dar. Modifiziert nach [136].

Die aus den Messungen erhaltenen Ergebnisse lassen sich grob in drei Gruppen unterteilen: für die Peptide 1 und 5 führt die Applikation der Mischung mit Hämin immer noch zu einem Verschluss des Kanals, während dieser Effekt nur noch in abgeschwächter Form für den

Einsatz der Peptide **2**, **3** und **16** erhalten bleibt. In Anwesenheit der Peptide **4**, **9** und **10** war kein Einfluss von Hämin auf den Kanal mehr zu beobachten, was auf eine sehr starke Peptid-Hämin-Interaktion hindeutet. Alle Messungen wurden an 4-6 verschiedenen Patches wiederholt. [136]

Zur Bestätigung der hohen Affinität der zuletzt erwähnten Peptide **4**, **9** und **10** wurden mit den Peptiden **9** und **10** zusätzlich Messungen durchgeführt, bei denen Hämin und Peptid zuvor in einer 1:1-Mischung (100 nM) miteinander inkubiert wurden. Beide Peptide zeigten auch hier die Fähigkeit hochaffin an Hämin zu binden und so einen Verschluss des Kanals zu verhindern, wobei Peptid **9** geringfügig besser war als Peptid **10** (Abb. 28). [136]

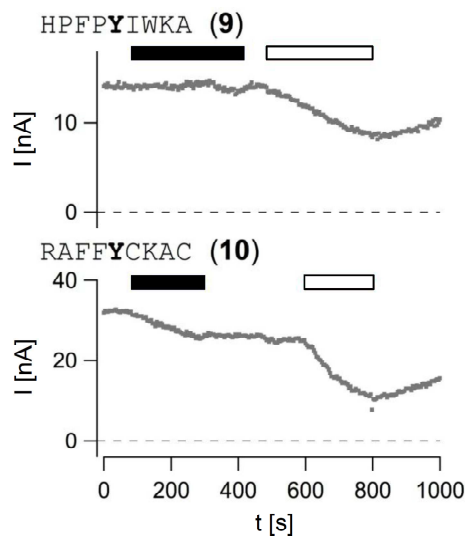


Abb. 28: Funktionelle Kompletionsstudien mit hSlo1-Kanalproteinen (exprimiert in *Xenopus*-Oozyten). Die Daten wurden wie in Abbildung 27 beschrieben von Inside-out-Patches erhalten. Zeitabhängiger Verlauf des maximalen Stromflusses bei 250 mV mit Markierung der Applikation der Hämin/Peptid-Mischung (100 nM/100 nM, schwarzer Balken) und einer nachfolgenden zweiten Applikation von Hämin alleine (100 nM, weißer Balken). Diese Experimente veranschaulichen, dass sogar bei einem äquimolaren Verhältnis das Peptid noch effektiv Hämin binden und damit den Verschluss des Kanals verhindern kann. Modifiziert nach [136].

Die erhaltenen Daten aus den Kompletionsstudien bestätigen und ergänzen die K_D -Werte, die aus den UV/Vis-Messungen abgeleitet werden konnten (Tab. 5). Peptid **1** zeigte erneut keine Bindung, während Peptid **5** sich als schlechter Bindungspartner für Hämin herausstellte. Das aus hEAG1 abgeleitete Peptid lässt vermuten, dass Bindungen an das Histidin in diesem Nonapeptid vermutlich nicht durch die unmittelbare Umgebung begünstigt sind und daher zu einer geringeren Affinität für Hämin führen. Im Gegensatz dazu steht das aus demselben Protein abgeleitete Peptid **16**, das eine deutlich höhere Affinität für Hämin in beiden Experimenten aufweist. Peptid **2** besitzt einen ähnlichen K_D -Wert im Vergleich zu Peptid **16** und wird ebenfalls in seiner Affinität durch die Kompletionsstudien bestätigt. Für Peptid **3** konnte aus den UV/Vis-Untersuchungen kein K_D -Wert ermittelt werden, da im

Rahmen der durchgeführten Messungen keine Sättigung erreicht wurde. Mit Hilfe der Kompetitionsstudien lässt sich jedoch erkennen, dass es sich bei diesem aus dem Screening der Peptidbibliothek abgeleiteten Peptid um einen hochaffinen Häminbinder handelt. Das Gleiche lässt sich für Peptid **4** beobachten, das ebenfalls aus diesem Screening stammte, und in der Einordnung der Affinitäten noch stärker Hämin binden kann als Peptid **3**. Somit wird deutlich, dass eine mangelnde Sättigung nicht unbedingt eine geringe Bindungskonstante bedeuten muss. Die hochaffinen Peptide **9** und **10** konnten auch in den Kompetitionsstudien als die am stärksten bindenden Peptide identifiziert werden, die sogar in äquimolaren Mengen zum Hämin (1:1) noch effizient den Verschluss des Kanals verhinderten.

Ergänzend sei zu Peptid **5** und **16** erwähnt, dass beide aus dem hEAG1-Kanal basierend auf einem von Sahoo vorgeschlagenen und untersuchten 22 Aminosäuren-langen Sequenzabschnitt (DICVHLNRKVFKEHPAFRLASD) abgeleitet wurden. [90] Sie weisen jedoch unterschiedliche Affinitäten für Hämin auf. Es ist daher zu vermuten, dass in dem vorgeschlagenen Sequenzausschnitt aus hEAG1 eine Regulation durch Hämin primär über Bindungen an Aminosäuren aus dem N-terminalen Sequenzabschnitt begünstigt wird.

UV/Vis-Messungen und die in dieser Arbeit durchgeführten Kompetitionsstudien mit dem Häm-bindenden Protein hSlo1 stellen somit effiziente Ansätze zur Untersuchung der Häminbindekapazität von Peptiden und Proteinen dar. Die Ergebnisse aus diesen Tests zu Häminbindekapazitäten der aus dem Screening ermittelten Sequenzen verdeutlichen darüber hinaus die Anwendbarkeit eines Peptidbibliotheksansatzes trotz der Interaktion von Hämin mit zunächst Polymer-gebundenen Peptiden (vgl. Kapitel 5.1.3). Darüber hinaus zeigt sich, dass aus dem Screening hochaffine Bindungspartner für Hämin abgeleitet werden können, die Aussagen über potentielle HRMs in Proteinen erleichtern können. Dieser Aspekt soll im nachfolgenden Kapitel genauer beleuchtet werden.

5.1.5 Vorhersage potentiell neuer Häm-regulierter Proteine

Die in Kapitel 5.1.3 getroffenen Aussagen zum Screening einer Peptidbibliothek mit Hämin können im Weiteren die Identifikation potentiell neuer HRMs aus bisher für die Regulation durch Häm/Hämin unbekannten Proteinen stimulieren. Außerdem können sie unterstützend für Untersuchungen zu HRMs an Proteinen genutzt werden, für die eine Häm-/Häminbindung bekannt ist, aber bisher keine genaue Häm-/Häminbindestelle beschrieben wurde.

Ein Abgleich der erhaltenen Spezifitäten (Tab. 4) mit bekannten humanen Proteinen, die in der UniprotKB-Datenbank gesammelt wurden, lieferte unter Verwendung des ScanProsite-Programms eine Zusammenstellung verschiedener potentiell Häm-regulierter Proteine, die in ihrer Primärstruktur eine Aminosäurezusammensetzung besaßen, wie sie in Tabelle 4

dargestellt ist. [138] Eine Auswahl dieser Proteine ist in Tabelle 6 zusammengestellt. Wichtig war bei der Analyse der potentiellen Kandidaten, dass die vorhergesagte Sequenz auf der Oberfläche der Proteine lag und zugänglich für Häm-in war, soweit eine Kristallstruktur verfügbar war und diese Beurteilung zuließ.

Tab. 6: Auswahl humaner Proteine, die eine potentielle Häm-/Häm-in-bindende Sequenz enthalten.

Protein	SP ^[a]	Sequenz
RanBP2-like and GRIP domain-containing proteins 1/2, 5/6	Q68DN6, Q99666	FKHF H SVDI
E3-SUMO-protein ligase RanBP2	P49792	FKHF H SVDI
Complement C4-A/B	P0C0L4, P0C0L5	FREF H LHLR
Cullin-7	Q14999	QRQF H VYQL
Cullin-9	Q8IWT3	QRQF H LFQL
Integrin α -11	Q9UKX5	QRQF H SPFI
ADP/ATP translocase 1	P12235	QREF H GLGD
Gamma-aminobutyric acid receptor subunit delta	O14764	SLHF H LRRN
Amyloid beta A4 precursor protein-binding family A member 1	Q02410	HLHF H SLEH
Dynein heavy chain domain-containing protein 1	Q96M86	QRIW H LYRV
Midasin	Q9NU22	ALHW H WVLH
PPAR-alpha-interacting complex protein 285	Q9BYK8	FRLW H QAVD
tRNA-dihydrouridine synthase 1-like	Q6P1R4	FKLW H HTLQ
Fucose-1-phosphate guanylyltransferase	O14772	QRIF H LLKG
Multimerin-2	Q9H8L6	QRLF H SLFG
High affinity cAMP-specific 3',5'-cyclic phosphodiesterase 7A	Q13946	FRIF H SQSE
Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 8	P40818	FRYY H SPTN
Lebercilin	Q86VQ0	QRLY H KLKE
Mucolipin-1	Q9GZU1	QRY H RGHV
Nucleolar complex protein 4 homolog	Q9BVI4	QRHY H PEVS
Arsenite methyltransferase	Q9HBK9	YLDY H MEKY
Alpha-adducin	P35611	YHDY H GILV
Golgi apparatus protein 1	Q92896	QRIL H QRAM
Fatty acyl-CoA reductase 1	Q8WVX9	HLLY H YWIA
Voltage-dependent R-type calcium channel subunit alpha-1E	Q15878	HLLY H AEFL
U2(RNU2) small nuclear RNA auxiliary factor 1-like 2	Q15696	HDDY H SRLR
Integrator complex subunit 3	Q68E01	HLLY H LRAS
DNA-directed RNA polymerase II subunit RPB2	P30876	HVLY H PQKP
Ataxin-7	O15265	HDDF H LVVL
Phosphatidylinositol-4-phosphate-3-kinase C2 domain-containing subunit gamma	O75747	HVEF H LLPY
CDK5 regulatory subunit-associated protein 1-like 1	Q5VV42	HNQF H EQVL
Cytokine-dependent hematopoietic cell linker	Q7Z7G1	HNEW H IGGY
Substance-P receptor	P25103	HNEW H YGLF
Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator	P13569	TVIL H EHRI
Endoribonuclease Dicer	Q9UPY3	TNIL H GIIF
Adenylate kinase domain-containing protein 1	Q5TCS8	LQGY H CPVTY
Homeobox protein ARX	Q96QS3	EPRR H CPVAA
Dipeptidyl peptidase 8	Q6V1X1	SDFK H CPIKE
Dysferlin	O75923	EELY H CPPIIT
Peroxisome biogenesis factor 1	O43933	KCVY H CPPPD
Acetyl-coenzyme A synthetase, cytoplasmic	Q9NR19	GAQR H CPIVD
5-aminolevulinic synthase, erythroid-specific, mitochondrial	P22557	GIGR H CPILA

^[a]SP primäre Zugriffsnummer von Swiss-Prot.

Um die Auswahl dieser Proteine zu untermauern, wurden ausgewählte Vertreter in Anlehnung an Untersuchungen von HBP23 [53, 91] als 23-mer Peptide, die den potentiell Häm-bindenden Sequenzabschnitt tragen, synthetisiert. Es wurde je ein Vertreter für eine Cys-, His- und Tyr-basierte Sequenz untersucht (Abb. 29). Alle drei Peptide zeigten eine deutliche Verschiebung der Soret-Bande, die die Bestimmung der jeweiligen Dissoziationskonstante ermöglichte. Die ermittelten K_D -Werte lagen im hohen nanomolaren bis niedrigen mikromolaren Bereich und wurden in den durchgeführten Kompetitionsstudien bestätigt (vgl. Kapitel 5.1.4). Auffällig war aber, dass Peptid **18** und **19** bathochrom, Peptid **20** hingegen hypsochrom verschoben war. Diese Besonderheit einiger spezieller Cys-tragender HRMs soll in Kapitel 5.2.2 genauer erläutert werden.

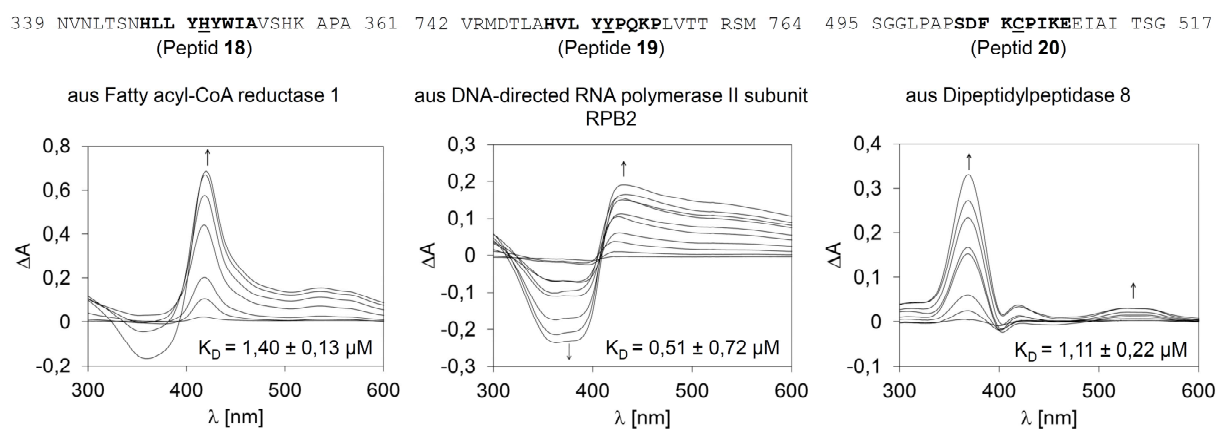


Abb. 29: Differenzabsorptionsspektren von ausgewählten Datenbank-abgeleiteten Peptiden mit Hämin in Abhängigkeit vom Hämin:Peptid-Verhältnis und die jeweiligen K_D -Werte. Für alle Peptide wurde ein deutlicher, sequenzspezifischer Effekt in Bezug auf die Applikation von Hämin beobachtet. Während die Peptide **18** (419 nm) und **19** (430 nm) einen bathochromen Effekt aufweisen, zeigt sich für Peptid **20** (369 nm) eine hypsochrome Verschiebung der Soret-Bande. [136]

Unter Durchführung der in Kapitel 5.1.4 beschriebenen Kompetitionsstudien mit dem Kaliumionenkanal hSlo1 unter physiologischen Bedingungen konnte gezeigt werden, dass alle drei Peptide (**18-20**) die Fähigkeit besitzen, mit dem Kanal um die Bindung von Hämin zu konkurrieren (Abb. 30). [136] Damit sind die erhaltenen Ergebnisse aus den UV/Vis-Studien bestätigt.

Abschließend lässt sich für die Datenbankuntersuchungen festhalten, dass die durchgeführten Bindungsstudien mit Peptiden aus potentiell Häm-bindenden Proteinen, die Vorhersage potentiell Häm-bindender Proteine bestätigt. Weiterführende Untersuchungen zu repräsentativen Proteinen aus Tabelle 6 können einen Einblick in die biologische Relevanz der hier beschriebenen Ergebnisse geben. Dipeptidylpeptidase 8 (DP8) und das daraus abgeleitete Peptid **20** soll als einer dieser Vertreter zur Unterstützung der in diesem

Kapitel dargelegten Untersuchungen in Kapitel 5.3 detaillierter in Bezug auf die Regulation und Bindung von Hämin charakterisiert werden.

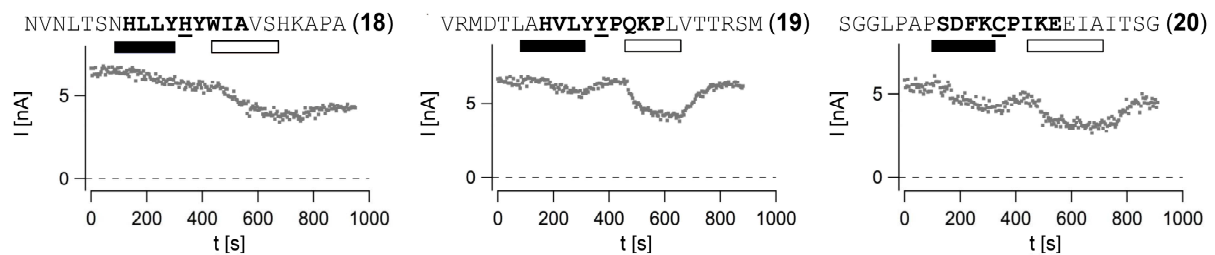


Abb. 30: Funktionelle Wettbewerbsstudien mit hSlo1-Kanalproteinen (exprimiert in *Xenopus*-Oozyten). Die Daten wurden wie in Abbildung 27 beschrieben von Inside-out-Patches erhalten. Zeitabhängiger Verlauf des maximalen Stromflusses bei 250 mV mit Markierung der Applikation der Häm/Peptid-Mischung (100 nM/100 nM, schwarzer Balken) und einer nachfolgenden zweiten Applikation von Häm allein (100 nM, weißer Balken). Modifiziert nach [136].

5.2 Klassifizierung der Häm-Peptid/Protein-Interaktion

Auf der Basis der potentiellen Einteilung Häm-bindender Sequenzen aus einem Screening einer Peptidbibliothek nach Art und Anzahl möglicher Häm-koordinierender Aminosäuren pro Vertreter wurde eine denkbare Klassifizierung für HRMs in Abbildung 24 vorgeschlagen. Um zu überprüfen, inwieweit sich diese Einteilung bestätigen lässt, sind umfangreiche Untersuchungen an Vertretern der jeweiligen Klassen unerlässlich.

Auf Grund der großen Anzahl literaturbeschriebener Vertreter (vgl. Kapitel 2.4.3) waren Cys-basierte Motive im Allgemeinen und CP-Motive im Speziellen für vertiefende Untersuchungen besonders geeignet. Es handelt sich bei letzterer um die bisher am besten untersuchte Gruppe von HRMs (vgl. Kapitel 2.4.3.2, Tab. 1). Aber auch verschiedene Vertreter aus Cys-basierten HBMs zeigen Interaktionen mit Fe^{III}-Häm im Bereich kurzer Sequenzabschnitte (vgl. Kapitel 2.4.2.1). Die Übertragbarkeit der in dieser Studie ermittelten Ergebnisse für HBMs ist jedoch begrenzt, da im Rahmen der dargelegten Untersuchungen ausschließlich Interaktionen mit Bindung von Häm an kurze Sequenzabschnitte untersucht werden. Dabei bleiben mögliche Interaktionen aus weiter entfernten Regionen der Proteine unberücksichtigt und können das Bindungsverhalten von Häm, z. B. bei Einlagerung in eine Häm-bindetasche, gegebenenfalls signifikant verändern.

Mit Hilfe der nachfolgenden Kapitel sollen die postulierten Klassen I - IV (Abb. 24), genauer die Klassen III und IV umfangreicher charakterisiert werden.

5.2.1 Auswahl Cys-basierter Peptide

Im Rahmen der Analyse Cys-basierter Sequenzen wurden 23 Peptide genauer charakterisiert. Dabei wurden Positivkontrollen aus Proteinen integriert, die ein CP-Motiv besitzen, wie z. B. Irr (**25**), humanes Per2 (**26**), HRI (**27**), DGCR8 (**22**) und IRP2 (**28**) (Tab. 7). [54, 56, 65, 119, 131, 149] Das Peptid **21** wurde aus dem HBM aus CBS abgeleitet. [150] Aus dem in Kapitel 5.1 beschriebenen Screening einer kombinatorischen Peptidbibliothek wurden die Peptide **31** und **32** ausgewählt und genauer charakterisiert, während die bereits in Kapitel 5.1.4 untersuchten Peptide **11-16** ebenfalls für die Auswertung berücksichtigt wurden. Einige der zu analysierenden Kandidaten (**12**, **14-16**, **22-25**, **27-28**, **32**, **36**) besaßen weitere potentiell Hämin-koordinierende Aminosäuren.

Zusätzlich wurde die UniProtKB-Datenbank mit Hilfe des ScanProsite-Programms unter Benutzung der in Kapitel 5.1.1 definierten Sequenz [STDENQ]-[SEQLV]-[STRAG]-[KRAG]-C-P-[FVYALI]-[LSVIYDE]-X nach neuen potentiell Häm-/Hämin-bindenden Proteinen mit CP-Motiv durchsucht. [138] Dabei wurden vergleichbar zur in Kapitel 5.1.5 beschriebenen Suche folgende Auswahlkriterien berücksichtigt:

1. Es wurden nur menschliche Proteine ausgewählt.
2. Die ermittelte Sequenz lag auf der Proteinoberfläche, so dass sie für Häm/Hämin frei zugänglich und nicht in sonstige Tertiärstrukturelemente wie Zink-Finger, Disulfidbrücken o. ä. involviert war.
3. Die vorhergesagte Sequenz befand sich nicht in transmembranalen Regionen der Proteine, sondern ausschließlich zytosolisch oder extrazellulär.

Die auf diesem Weg identifizierten Proteine (13 aus 145) sind in Tabelle 8 zusammengefasst.

In weiterführenden Untersuchungen wurden aus den Datenbankansätzen auf der Basis des Peptidbibliothekscreenings (vgl. Kapitel 5.1.5) und der zusammengefassten Konsensussequenz aus bekannten Häm-regulierten Proteinen mit CP-Motiv (Tab. 6) jeweils ein Cys-basierter, humaner Vertreter ausgewählt und in den weiterführenden Untersuchungen berücksichtigt. Es handelte sich dabei um Peptid **20** aus DP8 und Peptid **33** aus Interleukin-36 α (IL-36 α). Ein Protein, das ebenfalls aus den Datenbankuntersuchungen resultierte war Peptid **34** aus dem ferrous iron transport protein B (feoB) aus *Escherichia coli*. Sequenzabschnitte aus Jak2 (**29**) und der Proteintyrosinphosphatase 1B (PTP1B) (**35**) wurden basierend auf Untersuchungen von Yao *et al.* analysiert (vgl. Kapitel 2.2.2 und 2.3.5). Deren Untersuchungen an RTKs führten zur Suche von potentiell Häm-bindenden CP-Motiven in Proteintyrosinphosphatasen. Während SHP-1 und SHP-2 kein CP-Motiv auf ihrer Proteinoberfläche besaßen, konnte für PTP1B eines identifiziert werden (Peptid **35**).

Als Negativkontrollen wurden wie in Kapitel 5.1.3 das Cys-basierte all-Ala-Peptid **11** und eine weitere all-Ala-CP-Variante (**30**) verwendet.

Tab. 7: Charakterisierung der Bindung von Häm in an Cys-basierte Peptide.

Nr.	Peptidsequenz ^[a]	Herkunft [Referenz]	n.UV [nm] ^[b]	Soret [nm]	K _D für n.UV [μM]	K _D für Soret [μM]
<i>Cys-basierte Motive (ohne CP)</i>						
<i>A) Bekannte Motive</i>						
21	APSR C TWQL	CBS, <i>H. sapiens</i> [150]	364	419	4,41 ± 0,80	k.S.
22	SSIP C LHYK	DGCR8, <i>H. sapiens</i> [149]	366	410	0,81 ± 0,51	3,99 ± 2,35
<i>B) Vorhergesagte Motive</i>						
11	AAAA C AAAA	Negativkontrolle	-	-		k.B. ^[d]
12	RDQY C SPTK	Screening		425		k.S.
13	QFSQ C RIBN	Screening		424		2,78 ± 0,78
14	FYWD C NHYW	Screening		420		0,67 ± 0,12
15	YVSR C IBBA	Screening		430		3,44 ± 0,64
16	RADI C VHLN	hEAG1, <i>H. sapiens</i> [90]		430		0,40 ± 0,17
23	DIC V HLNRK	hEAG1, <i>H. sapiens</i> [90]	368		k.S. ^[c]	
24	SSIP C LFYK	Mutante von 22 , <i>H. sapiens</i>	369		0,28 ± 0,19	
<i>Cys-Pro-basierte Motive (CP-Motive)</i>						
<i>A) Bekannte Motive</i>						
25	ALTG C PWHD	Irr, <i>B. japonicum</i> [65, 119]	368		5,32 ± 0,55	
26	SQSS C PAVP	hPer2, <i>H. sapiens</i> [56]	364		6,43 ± 0,53	
27	DES A CPYVM	HRI, <i>H. sapiens</i> [131]	364		3,27 ± 1,44	
28	TPIL C PFHL	IRP2, <i>H. sapiens</i> [54]	368	415	0,60 ± 0,41	2,03 ± 1,38
29	RPDG C PDEI	Jak2, <i>H. sapiens</i> [89]	398			0,50 ± 0,23
<i>B) Vorhergesagte Motive</i>						
30	AAAA C PAAA	Negativkontrolle	364		4,73 ± 1,83	
31	IGVV C PFVR	Screening	368		0,87 ± 0,41	
32	QFSS C PHYW	Screening	368	422	1,94 ± 0,42	10,37 ± 1,19
33	SEGG C PLIL	IL-36α, <i>H. sapiens</i>	366		3,75 ± 0,77	
20	SGGLPAPSDFK C PI KEEIAITSG	DP8, <i>H. sapiens</i>	369		1,42 ± 0,24	
34	ARLG C PVIP	feoB, <i>E. coli</i>	367		1,37 ± 0,33	
35	EDKD C PIKE	PTP1B, <i>H. sapiens</i>	368		48,40 ± 2,73	
36	DES A CPVYM	Mutante von 27 , <i>H. sapiens</i>	367		13,26 ± 1,44	

^[a]Alle Peptide wurden als C-terminale Amide synthetisiert. B, Norleucin. ^[b]n. UV, nahe UV-Bande. ^[c]k.S., keine Sättigung. ^[d]k.B., keine Bindung.

Tab. 8: Potentiell Häm-bindende, humane Proteine abgeleitet aus einer literaturbasierten Datenbanksuche unter Benutzung der Sequenz [STDENQ]-[SEQLV]-[STRAG]-[KRAG]-C-P-[FVYALI]-[LSVIYDE]-X.

Protein	SP ^[a]	Sequenz
Alpha-ketoglutarate-dependent dioxygenase alkB homolog 3	Q96Q83	SLGR CP IIA
Eukaryotic translation initiation factor 2-alpha kinase 1	Q9BQI3	DESAC PYVM
F-box/LRR-repeat protein 16	Q8N461	SLAG CP LLT
RAS guanyl-releasing protein 4	Q8TDF6	SVRG CP ALE
Hematopoietic SH2 domain-containing protein	Q96JZ2	EEAA CP VSA
Interleukin-36 alpha	Q9UHA7	SEGG CP LIL
Macrophage erythroblast attacher	Q7L5Y9	TLSG CP AVD
Protein kinase C-binding protein NELL2	Q99435	ESSG CP ALD
Homeobox protein prophet of Pit-1	O75360	ESTAC P YSY
Proto-oncogene tyrosine-protein kinase receptor Ret	P07949	EEAG CP LSC
RAD50-interacting protein 1	Q6NUQ1	SSSA CP LLL
Thrombomodulin	P07204	NQTAC P ADC
Vacuolar protein sorting-associated protein 13A	Q96RL7	QVRAC P FLP

^[a]SP, primäre Zugriffsnummer von Swiss-Prot.

5.2.2 Bindekapazität Cys- und Cys-Pro-haltiger Motive

Im Rahmen der UV/Vis-Messungen zur Auswertung und Quantifizierung der Bindung von Hämin an Cys-basierte Peptide konnte bereits in Kapitel 5.1.4 eine bathochrome Verschiebung der Soret-Bande zu ~420 nm beobachtet werden. Diese ist in Abbildung 31A für die Peptide **12-16**, repräsentativ durch Peptid **12** dargestellt (vgl. auch Abb. 26). In weiterführenden Untersuchungen in Kapitel 5.1.5 wurde jedoch für ein weiteres Cys-basiertes Peptid, im Speziellen eines Cys-Pro-basierten Peptids (**20**) ein vollkommen anderes Verhalten im UV/Vis-Spektrum mit einem hypsochromen Shift der Soret-Bande zu ~370 nm beobachtet (Abb. 29). Diese wird auch als "nahe UV-Bande" bezeichnet [151] und findet sich in anderen Studien mit Peptid/Protein-Häm-Komplexen (z. B. für hPer2, STC1/2, ATE1, PpsR, Irr, HRI) wieder. [56, 58, 70, 119, 127, 131, 132] Ein vergleichbarer Effekt findet sich für die Komplexe aus Hämin und den z. T. aus den genannten Proteinen abgeleiteten Peptiden **23-27**, **30-31** und **33-36** (repräsentativ Peptid **31** in Abb. 31B). Auf Grund der ermittelten Unterschiede in den UV/Vis-Spektren der Peptide aus Tabelle 7 wurde daher eine Einteilung der Peptide in Gruppen durchgeführt (Abb. 31). Dabei wurde Gruppe 1 durch Peptide gebildet, die ausschließlich eine bathochrome Verschiebung der Soret-Bande zu ~420 nm im Spektrum aufweisen, während Gruppe 2 nur Peptide enthielt, die im Komplex mit Hämin ihr Absorptionsmaximum bei ~370 nm besaßen. In eine dritte Gruppe wurden die Peptide **21-22**, **28** und **32** eingeordnet, die sich durch das Auftreten von zwei Absorptionsmaxima im UV-Spektrum bei ~370 nm sowie bei ~420 nm auszeichneten (Abb. 30C für Peptid **21**). Peptide **11** und **29** kennzeichneten sich durch keine der genannten Eigenschaften der Gruppen 1-3 aus. Während Peptid **11** als Negativkontrolle Hämin nicht

gebunden hatte, zeigte Peptid **29** ein deutliches Signal der Soret-Bande jedoch bei 400 nm (Abb. 31D).

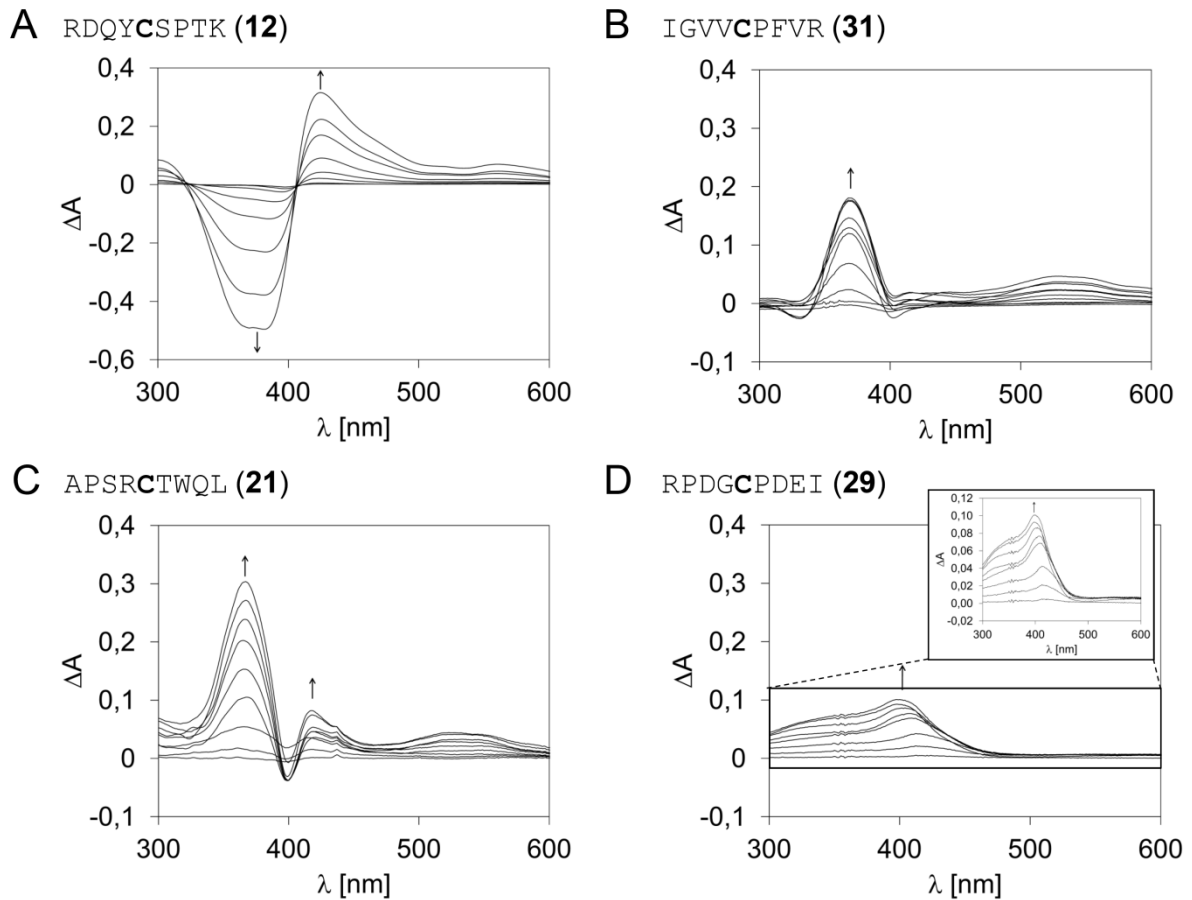


Abb 31: Differenzabsorptionsspektren von ausgewählten Peptiden mit Häm in Abhängigkeit vom Häm:Peptid-Verhältnis. [137] Jedes Spektrum (A-D) stellt einen auffälligen Effekt nach Zugabe von Häm dar, auf dessen Grundlage die Einordnung der Peptide in vier Gruppen erfolgte. (A) Peptid **12** als Repräsentant der Gruppe 1 veranschaulicht die bathochrome Verschiebung der Soret-Bande zu ~420-430 nm. (B) Eine hypsochrome Verschiebung der Soret-Bande zu ~370 nm wurde für Peptid **31** beobachtet (Gruppe 2). (C) Für Peptid **21** (Gruppe 3) war das Auftreten von zwei Absorptionsmaxima bei ~370 nm und ~420-430 nm charakteristisch. (D) Eine Gruppe aus weniger effizient oder anders bindenden Peptiden (Gruppe 4) wird durch Peptid **29** repräsentiert (Kasten: vergrößertes Spektrum).

Beim Vergleich der Gruppen 1 und 2 untereinander ist auffällig, dass fast ausschließlich Peptide mit CP-Motiv in die 2. Gruppe einzuordnen sind, während in ersterer ausschließlich Peptide auftraten, die nur Cys-basiert (ohne nachfolgendes Prolin) waren. Peptid **23** ist die einzige Ausnahme, die trotz des Fehlens des Prolins nach dem Cystein eine hypsochrome Verschiebung der Soret-Bande aufweist. Dieser Fall ist auch für die bereits erwähnten Protein/Peptid-Häm-Komplexe aus ATE1, PpsR und STC1 bekannt. [58, 70, 127] Ein Prolinrest ist daher nicht zwingend notwendig für die Entstehung der nahen UV-Bande.

Weiterführende Betrachtungen zur Umgebung der untersuchten Peptide weisen im Allgemeinen einen Mangel an negativ geladenen Aminosäuren im C-terminalen Bereich auf, während N-terminal dieser Effekt nicht zu beobachten war. Wie in Kapitel 2.4 ausgeführt, sind auf der Basis umfangreicher bioinformatischer Studien von bekannten Strukturen Häm-bindender Proteine hydrophobe und basische Aminosäuren für die Interaktion mit Häm bevorzugt, während letztere durch Interaktion mit den Propionatseitenketten des Häms stabile Salzbrücken ausbilden können. [106, 111, 112] Im Rahmen der untersuchten Peptide findet man für 74% aller Peptide mindestens eine positiv geladene Aminosäure auf einer der beiden Seiten des Cysteins. Damit stellen die in Tabelle 7 aufgelisteten Peptide den ersten experimentellen Befund zur Bestätigung der zuvor genannten Präferenzen für spezielle Aminosäuren zur Häm-/Häminbindung dar.

Sechs der untersuchten Peptide (**11, 26, 27, 30, 33, 36**) trugen keine basische Aminosäure. Charakteristisch für diese war dagegen ein sehr hydrophober C-Terminus, was erneut die in Kapitel 2.4 erläuterten Bevorzugungen bestätigt. Dort wurden Interaktionen der Oberfläche des Tetrapyrrolrings sowie der daran gebundenen Methyl- und Vinylgruppen mit hydrophoben Aminosäuren wie Leucin, Phenylalanin und Tyrosin, aber auch Valin, Alanin und Isoleucin beobachtet. Darüber hinaus wurden auch hydrophobe, aromatische Interaktionen vor allem mit Phenylalanin diskutiert, die durch van-der-Waals-Wechselwirkungen mit dem Porphyringerüst verursacht werden. [111] Neben den bereits aufgezählten Peptiden trugen auch alle anderen Cys-basierten Vertreter eine oder mehrere hydrophobe Aminosäuren. Auffällig war, dass ca. 50% aller Peptide eine der aromatischen Aminosäuren Phe, Tyr, Trp oder His an Position +2 relativ zum Cystein trugen. Im Weiteren war für diese Position aber auch eine Bevorzugung durch hydrophobe Aminosäuren zu erkennen. Es handelt sich dabei um ein Phänomen, das bereits von Steiner *et al.* für mitochondriale Hämylasen beobachtet wurde, in denen ein CPV-Motiv als konserviert für die Hämbindung bestimmt werden konnte. [126] Bioinformatische Studien mit umfangreicheren Datensätzen bestätigten das ebenfalls mit Untersuchungen zu Hämbindetaschen, die sich vorrangig durch das Auftreten unpolarer und im Speziellen aromatischer Aminosäuren auszeichneten. [106, 111] Andere charakteristische Interaktionen, die für die hohe Konservierung von aromatischen Aminosäuren sprechen, sind stabilisierende Packungsinteraktionen mit dem axialen Liganden, wie sie z. B. für Cytochrom P450 2C8 gefunden werden können (vgl. Kapitel 2.4, Abb. 16). [111] Es lassen sich somit Ähnlichkeiten zwischen HBMs aus Proteinen und den hier für HRMs diskutierten Peptiden in Bezug auf das Auftreten von Cystein als axialen Liganden des Häms und der Bevorzugung von hydrophoben und aromatischen Aminosäuren in der unmittelbaren Umgebung zum Häm ableiten.

Die Bedeutung der bisher genannten Befunde spiegelt sich auch in den ermittelten K_D -Werten (Tab. 7) wieder, die vor allem für Peptide, die die oben genannten Kriterien erfüllen, am niedrigsten waren. Im Speziellen trifft das auf die Peptide **14**, **16**, **22**, **24**, **28** und **31** zu, die ein C-X/P-H/F-Motiv besaßen und Dissoziationskonstanten unter 1 μM hatten. Das Auftreten unpolarer, nicht-aromatischer Aminosäuren (Ala, Ile, Leu, Val, Nle) in C-terminalen Positionen in den Peptiden **13**, **15**, **20**, **26**, **30**, **33** und **34** führte zu Dissoziationskonstanten zwischen 1,37 und 6,43 μM . Vergleichbare Affinitäten wurden auch für die Peptide **21**, **25** und **32** beobachtet, in denen C-terminal ein Tryptophan auftrat. Dennoch war diese Aminosäure nicht so bevorzugt vorzufinden, wie Phenylalanin oder Histidin.

Die Affinitäten einiger Peptide (**12**, **21**, **23**, **25**, **27**, **29**, **32**, **35-36** und Kontrollpeptid **11**) ließen sich an Hand der bisher geführten Diskussion nicht begründen und müssen daher in einem anderen Zusammenhang betrachtet werden. Der größte Einfluss auf die Bindungsaffinität wurde für Peptid **35** ($48,40 \pm 2,73 \mu\text{M}$) beobachtet. Es besitzt zwar eine identische C-terminale Sequenz (CPIKE) wie Peptid **20**, dennoch ist die Affinität von Häm in für Peptid **20** ($1,42 \pm 0,24 \mu\text{M}$) signifikant größer als für Peptid **35**. Der entscheidende Unterschied liegt im N-terminalen Bereich der Peptide, der sich bei Peptid **35** (EDKD) durch das Auftreten einer hohen Anzahl negativ geladener Aminosäuren gegenüber Peptid **20** (SDFK) auszeichnet. Saure Aminosäuren wie z. B. Glutaminsäure werden auch in anderen Zusammenhängen für die Abstoßung des Häms diskutiert und können damit die Affinität der Peptide/Proteine senken. [114] Dennoch kann ein C-Terminus, der die bisher diskutierten Kriterien für eine bevorzugte Hämbindung erfüllt, den Einfluss negativ geladener Aminosäuren im N-Terminus der Peptide kompensieren, wie man an den Peptiden **27** (DESACPYVM, $3,27 \pm 1,44 \mu\text{M}$) und Peptid **36** (DESACPVYM, $13,26 \pm 1,44 \mu\text{M}$) erkennt. Auch hier zeigt sich erneut, dass Position +2 eine entscheidende Bedeutung für die Hämbindung hat, denn die Sequenz 'YVM' in Peptid **27** mit einer aromatischen Aminosäure an der betreffenden Stelle weist eine höhere Affinität für Häm in auf als 'VYM' in Peptid **36**.

Peptid **29** (abgeleitet aus Jak2) mit einem K_D -Wert von $0,50 \pm 0,23 \mu\text{M}$ zeigte ein vollkommen anderes Verhalten im UV/Vis-Spektrum als die anderen, da eine Verschiebung der Soret-Bande zu $\sim 400 \text{ nm}$ beobachtet wurde (Abb. 31D). Charakteristisch für die Aminosäurezusammensetzung des Peptids ist das Vorhandensein der negativ geladenen Aminosäure Asparaginsäure an Position +2 und -2, die die Sequenz eher untypisch für die Hämbindung im Vergleich zu allen anderen Peptiden macht. Dennoch findet man auch die für eine hohe Affinität bevorzugten basischen (Arg) und hydrophoben (Ile im C-Terminus) Aminosäuren wieder.

Zur Validierung der erhaltenen Ergebnisse aus den UV/Vis-Studien in einer physiologischen Umgebung wurde, wie für die erste Serie an Peptiden in Kapitel 5.1.4, für ausgewählte Peptide die Fähigkeit untersucht, mit dem Kaliumionenkanal hSlo1 um die Bindung von

Hämin zu konkurrieren. [137] Die verwendeten Peptide sowie die beobachteten Ergebnisse zur Konkurrenz um Hämin sind in Abbildung 32 dargestellt und in Tabelle 9 qualitativ zusammengefasst. Die Effizienz der Peptide, den Verschluss zu verhindern war für die Peptide **22** und **31-33** besonders hoch, während sie für die Peptide **12**, **26-28** und **36** geringer war. Im Allgemeinen stimmen diese Ergebnisse mit den erhaltenen K_D -Werten überein und bestätigen erneut die Übertragbarkeit der Resultate aus den UV/Vis-Messungen auf andere Systeme.

Tab. 9: Qualitative Auswertung der Häminbindung aus den Wettbewerbsstudien in Anlehnung an die in Tabelle 5 eingeführte Einstufung der Häminbindung. Im Durchschnitt zeigen alle untersuchten Cys-basierten Peptide eine moderate bis starke Häminbindung und bestätigen damit die ermittelten K_D -Werte. [136, 137]

Nr.	Peptidsequenz ^[a]	Herkunft [Referenz]	Häminbindekapazität ^[b]
12	RDQYCSPTK	Screening	+
16	RADICVHLN	hEAG1, <i>H. sapiens</i> [90]	+
20	SGGLPAPSDFKCPI	DP8, <i>H. sapiens</i>	+
	KEEIAITSG		
22	SSIPCLHYK	DGCR8, <i>H. sapiens</i> [149]	++
26	SQSSCPAVP	hPer2, <i>H. sapiens</i> [56]	+
27	DESACPYVM	HRI, <i>H. sapiens</i> [131]	+
28	TPILCPFHL	IRP2, <i>H. sapiens</i> [54]	+
31	IGVVCPFVR	Screening	++
32	QFSSCPHYW	Screening	++
33	SEGGCPLIL	IL-36 α , <i>H. sapiens</i>	++
36	DESACPVYM	Mutante von 27 , <i>H. sapiens</i>	+

^[a]Alle Peptide wurden als C-terminale Amide synthetisiert. ^[b]Die Auswertung der kompetitiven Bindungsstudien erfolgte wie folgt: '+' moderate Häminbindung, '++' starke Häminbindung.

Aus den Ergebnissen der UV/Vis-Messungen lässt sich somit erkennen, dass Peptide, die aus beschriebenen biologisch relevanten Vertretern für die Hämregulation abgeleitet wurden, vergleichbare Affinitäten wie für die Bindung zum Protein zeigten. [54, 131] Im Allgemeinen sind Interaktionen von Peptiden mit Hämin häufig im mikromolaren Bereich angesiedelt. [55, 70, 131] Für Peptide, für die die K_D -Werte von den in der Literatur berichteten Angaben bei der Interaktion mit dem Protein abweichen, müssen vermutlich noch weitere Interaktionen berücksichtigt werden, wie es zum Beispiel bei HRI der Fall ist, für das eine Hexakoordination diskutiert wird. [131] Solche Effekte haben zusätzliche Einflüsse auf die Stabilisierung der Häminbindung. Mit Hilfe der hier beschriebenen Peptide konnte aber gezeigt werden, dass die Bindung an das beschriebene HRM genügt. Diese Untersuchungen können damit weitere Informationen über die Bindung von Hämin an Proteine liefern und als Modellsysteme für die Betrachtung der jeweiligen Interaktion genutzt werden.

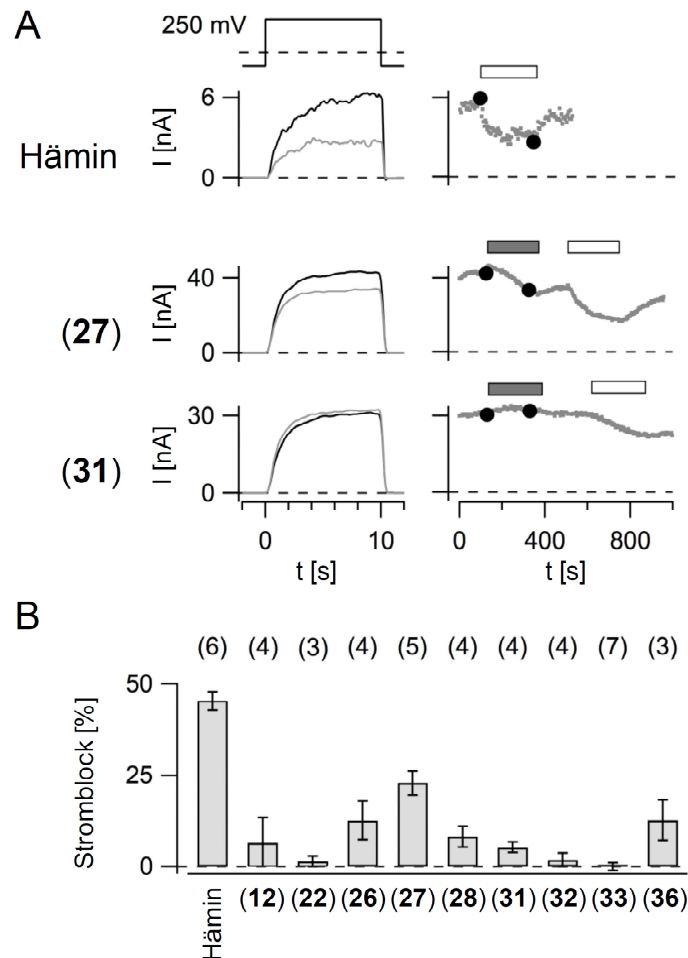


Abb. 32: Cys-basierte Peptide konkurrieren mit hSlo1 um Hämin. (A, oben) Stromflüsse, die durch hSlo1 verursacht wurden, wurden während der Depolarisation auf 250 mV vor (schwarz) und nach (grau) der Anwendung von Hämin (100 nM) gemessen (links); zeitabhängige Verläufe der maximalen Stromflüsse bei 250 mV (rechts). Der weiße Balken markiert die Applikation von Hämin. (A, unten) Ähnliche Experimente wie im oberen Teil der Abbildung aber zuerst wurde eine äquimolare Mischung aus Hämin und dem jeweiligen Peptid (jeweils 100 nM) appliziert (grauer Balken); nach dem Waschen mit Kontrollpuffer wurde nur Hämin appliziert (100 nM, weißer Balken). Die schwarzen Symbole stellen Datenpunkte aus der Auftragung der Stromverläufe (links) dar. (B) Durchschnittlicher Block des Kaliumionenkanals hSlo1 nach 250 s Applikation einer Mischung aus Hämin und dem jeweiligen Peptid (jeweils 100 nM). "Hämin" bedeutet, dass ausschließlich Hämin (100 nM) appliziert wurde. Die Daten sind Durchschnittswerte \pm Standardabweichung mit (n) in Klammern oberhalb des jeweiligen Balken dargestellt. In Anwesenheit der Peptide war in allen Fällen das Potential des Blocks der Kanäle geringer als unter Kontrollbedingungen ($P < 0,01$). Kontrollapplikationen der Peptide alleine (100 nM) inhibierten den Kanal nicht. In manchen Fällen konnte ein plötzlicher Anstieg des Stromflusses um 10 - 15% beobachtet werden. An Hand der jeweiligen Kinetiken konnte dieser Effekt aber deutlich vom langsamen Block, der durch Hämin verursacht wurde, unterschieden werden. Modifiziert nach [137].

Interessanterweise zeigte sich auch bei den für die Häminbindung postulierten Peptiden **20**, **33** und **34**, die aus den jeweils beschriebenen Datenbankrecherchen abgeleitet wurden, ebenfalls ein eindeutige Bindung im niedrigen mikromolaren Bereich, die sich für die untersuchten Vertreter in den Kompetitionsstudien bestätigte. Weiterführende

Untersuchungen mit diesen Peptiden erscheinen daher vielversprechend und können damit Aufschluss über bisher für die Bindung von Hämin unbekannte Proteine geben. Das für die Häminbindung postulierte PTP1B-abgeleitete Peptid **35** bestätigte sich nicht als adäquater Ligand für Hämin. Die Auswahl des Motivs basierte ausschließlich auf dem Vorhandensein oberflächenlokalisierter CP-Sequenzen des Proteins und die weitere Umgebung wurde im Gegensatz zu den durch Datenbankrecherche ermittelten Peptide **20**, **33** und **34** nicht berücksichtigt. Mit den ermittelten Dissoziationskonstanten der Peptide bestätigte sich jedoch, dass die Gestalt der Umgebung unabhängig vom Auftreten der koordinierenden Aminosäuren einen entscheidenden Einfluss auf die Hämbindung haben muss und nicht unberücksichtigt bleiben sollte.

Nach Analyse der Peptide lässt sich im Rahmen der dargestellten Ergebnisse aus den UV/Vis-Messungen ableiten, dass eine Gruppierung der untersuchten Peptide offensichtlich ist und sinnvoll erscheint. Obwohl sich aus den Eigenschaften der UV/Vis-Spektren noch keine deutlichen Klassen, wie sie in Abbildung 24 postuliert werden, ableiten lassen, zeigen sich dennoch charakteristische Sequenzmerkmale, die die Häminbindung stimulieren können. Die Herkunft der beobachteten Effekte kann jedoch nicht ausschließlich über Sequenzvergleiche in Verbindung mit den UV/Vis-Spektren diskutiert werden. Hierzu müssen neben den funktionellen auch strukturelle Untersuchungen, wie Resonanz-Raman-, EPR- und NMR-Spektroskopie durchgeführt werden, um detailliertere Aussagen zu Bindungsmodus sowie Koordination des Fe^{III} -Ions im Hämin machen zu können.

5.2.3 Strukturuntersuchungen an verschiedenen Hämin-Peptid-Komplexen

Klassische Methoden der Strukturuntersuchungen von Hämin-Interaktionen mit Peptiden und Proteinen stellen die Resonanz-Raman- und EPR-Spektroskopie, aber auch Circular dichroismus dar. [25, 56, 91, 117, 119, 152] Diese Ansätze liefern jedoch nur begrenzt Informationen über die vielfältigen Interaktionen, die Hämin mit einzelnen Aminosäuren aus den jeweiligen Peptiden und Proteinen eingehen kann. Daher sind weiterführende Untersuchungen zur Ermittlung einer Struktur mittels Röntgenkristallstrukturanalyse oder NMR-Spektroskopie unumgänglich, wie sie für verschiedene Vertreter bereits beschrieben sind. [75, 108, 110, 128]

Im Rahmen der Analyse Cys-basierter Peptide sollten zur Aufklärung des UV/Vis-spektroskopischen Verhaltens aus den jeweiligen Gruppen ausgewählte Vertreter untersucht werden. Im Gegensatz zu den in Kapitel 5.2.2 eingeführten Gruppen 2 und 3 sind für Gruppe 1 mehrere Vertreter in der Literatur beschrieben, die eine bathochrome Verschiebung der Soret-Bande bei Bindung von Hämin zur Folge haben. Die klassischen Vertreter sind die bereits in Kapitel 2.4.2.1 beschriebenen Cytochrom-P450-Proteine. Daher

wurde für die nachfolgenden Studien für Gruppe 1 ausschließlich Peptid **12** betrachtet, das sich nach den Kompetitionsstudien als starker Häminbinder herausstellte (Tab. 9). Für die Häm-regulierten CP-Motive sind bisher wenige Informationen über strukturelle Aspekte bekannt. Bisherige Untersuchungen lassen jedoch vermuten, dass Hämin bevorzugt einen pentakoordinierten Komplex mit der Thiol-Funktion des Cysteins bildet. [59, 119] Um diesen Effekt genauer zu evaluieren, wurde eine größere Auswahl an Peptiden aus den Gruppen 2 (**20**, **23**, **27**, **34**) und 3 (**22**, **28**) der Cys-basierten Peptide gewählt und im Komplex mit Hämin untersucht. Die Resonanz-Ramanspektren der Komplexe sowie von freiem Hämin zeigten vier charakteristische Banden im spektralen Bereich zwischen 1300 und 1700 cm^{-1} (Abb. 33, Tab. 10). Diese konnten den jeweiligen Schwingungen innerhalb des Porphyrinrings zugeordnet werden und variierten mit der Größe des Porphyringrundgerüsts. [152, 153] Die Proben wurden mit einem Laser bei 413 nm angeregt, um den Resonanz-Raman-Effekt in der unmittelbaren Umgebung der Soret-Bande auszunutzen und so selektiv die Banden für Schwingungen des Hämins zu verstärken. Das erhaltene Raman-Signal war u. a. für Peptid **22** intensiver im Vergleich zu z. B. Peptid **20**, da die verursachte Verschiebung der Soret-Bande näher an der Anregungswellenlänge lag (vgl. Kapitel 5.2.2). Vergleichbare Effekte ließen sich auch für die anderen Peptide beobachten und deckten sich mit den erhaltenen Ergebnissen der UV/Vis-Messungen.

Tab. 10: Porphyrinringschwingungen für verschiedene Hämin-Peptid-Komplexe (Abb. 33). [137]

Peptid	$\nu_4 [\text{cm}^{-1}]$	$\nu_3 [\text{cm}^{-1}]$	$\nu_2 [\text{cm}^{-1}]$	$\nu_{11} [\text{cm}^{-1}]$	$\nu_{10} [\text{cm}^{-1}]$
- (Hämin)	1372	1490	1568	1590	1626
12	1372	1489	1571	1588	1629
20	1370	1490	1568	1589	1626
22	1379	1500	1588	-	1636
23	1373	1490	1573	1589	1624
27	1375	1491	1571	1590	1631
28	1376	1504	1590	-	1640
34	1372	1489	1572	1590	1623

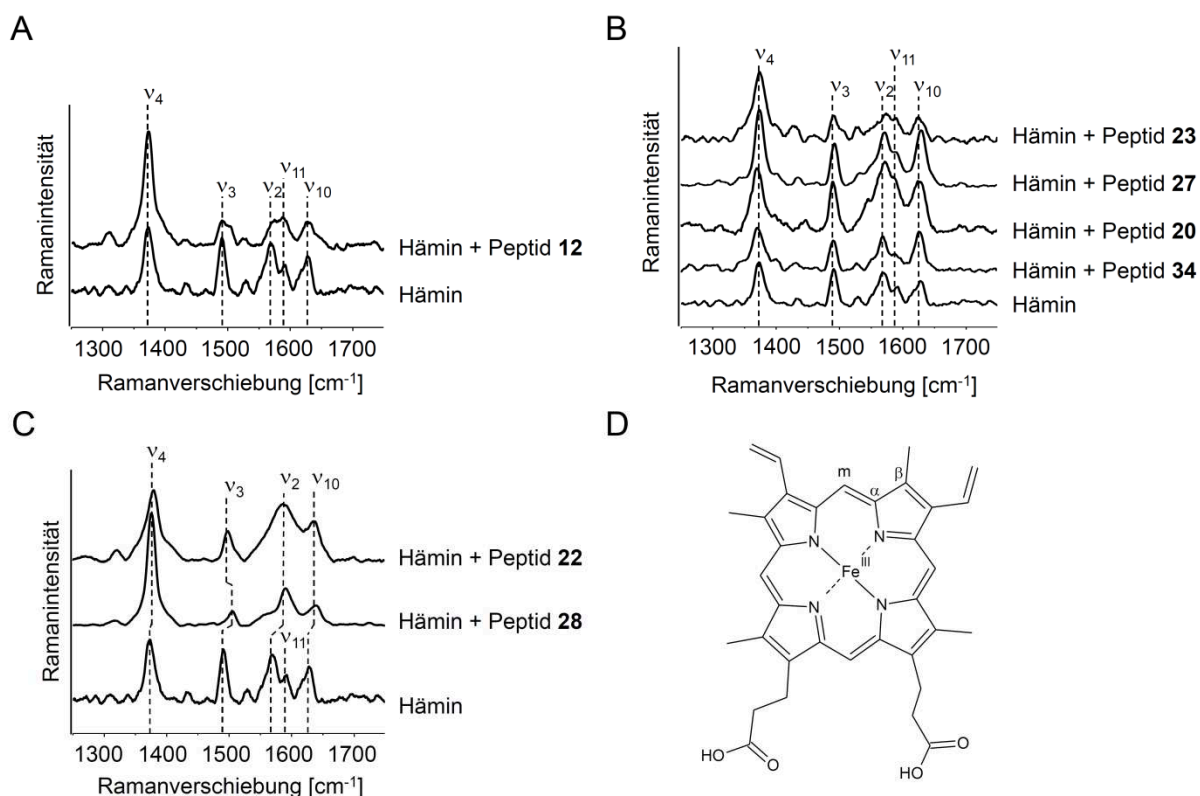


Abb. 33: Resonanz-Ramanspektren der Hochfrequenz-Fingerprint-Region von reinem Hämin und (A) Peptid **12** aus Gruppe 1, (B) Peptide **20**, **23**, **27** und **34** aus Gruppe 2 und (C) Peptid **22** und **28** aus Gruppe 3. [137] Die Einteilung der Gruppen ist analog zu den UV/Vis-Untersuchungen in Kapitel 5.2.2. Die Wellenzahlen der prominenten Schwingungsbanden ν_{10} , ν_{11} , ν_2 , ν_3 und ν_4 sind in Tabelle 10 aufgeführt und werden im Text ausführlich diskutiert. (D) Nomenklatur für ausgewählte Kohlenstoffatome von Hämin. Modifiziert nach [152].

Die Koordination des Fe-Ions wird bekanntermaßen durch die Lage der ν_3 -Schwingungsbande reflektiert, die durch C ^{α} -C ^{β} -Streckschwingungen des Porphyrinrings verursacht wird (Abb. 33D). [154] Sie ist besonders empfindlich für Änderungen in der Größe des Porphyrinrundgerüsts. [153] In Bezug auf die gemessenen Ramanspektren ergibt sich für die Gruppen 1 und 2 und deren Vertreter eine Lage der ν_3 -Schwingungsbande bei ca. 1490 cm⁻¹ (Abb. 33A und B, Tab. 10). Dieser Zusammenhang verdeutlicht das Vorliegen des Fe^{III}-Ions des Hämins in pentakoordinierter Form, wie es z. B. Ishikawa *et al.* für das durch Cystein gebundene Hämin in dem Protein Irr mit einer ν_3 -Schwingungsbande bei 1492 cm⁻¹ gezeigt haben. [119] Im Gegensatz dazu stehen hexakoordinierte Zustände des Fe^{III}-Ions, die die Lage der ν_3 -Schwingungsbande zu höheren Wellenzahlen verschieben. [119, 153] Dieser Fall findet sich für die Peptide **22** und **28** aus Gruppe 3 der untersuchten Cys-basierten Peptide (Abb. 33C, Tab. 10).

Zusätzlich werden die erhaltenen Resultate durch die Lage der ν_2 -Schwingungsbande (C ^{β} -C ^{β} -Streckschwingung des Porphyrinrings) unterstützt, für die ebenfalls bekannt ist, dass sie (geringer) sensitiv für die Koordination des Fe^{II/III}-Ions ist [153-155] Sie trat bei ähnlichen

Wellenzahlen für Peptide der Gruppe 1 und 2 auf ($\sim 1570\text{ cm}^{-1}$) und war erneut für die Peptide der Gruppe 3 verschoben ($\sim 1585\text{ cm}^{-1}$, Tab. 10). Um sichzustellen, dass die erhaltenen Resonanz-Ramanspektren tatsächlich den Komplex aus Peptid und Häm darstellen und somit eine Interaktion der beiden Moleküle stattfand, konnte wie für Peptid **20** erkennbar die Form der ν_2 -Schwingungsbande als Parameter herangezogen werden. Diese verändert sich in Abhängigkeit von der Anwesenheit des Peptids und bestätigte damit die in den UV/Vis-Messungen gefundene Interaktion. Eine weitere Bande (ν_{11}), die als Schulter der ν_2 -Schwingungsbande für Häm alleine auftrat und ebenfalls repräsentativ für die C^β - C^β -Streckschwingung des Porphyrinrings steht, verschwand nahezu nach Inkubation mit dem Peptid. [154] Diese Ergebnisse deuten ebenfalls auf eine Änderung der Umgebung des Hämins hin und veranschaulichen damit die Interaktion zwischen Häm und Peptid.

Die ν_4 -Schwingungsbande beschreibt die Besetzung der HOMOs und LUMOs des Porphyringrundgerüsts und ist damit sensitiv für den Oxidationszustand des Fe-Ions. [153, 154] Sie liegt bei den untersuchten Vertretern zwischen 1370 und 1381 cm^{-1} und bestätigt damit das Vorhandensein des Fe^{III} -Ions des Hämins. [155] Bei einzelnen Vertretern wie z. B. Peptid **20** kam es zu einer Verbreiterung dieser Bande, was auf durch das Peptid induzierte Schwankungen in der Orbitalbesetzung zurückgeführt werden kann. Die ν_{10} -Schwingungsbande stellt asymmetrische Schwingungen zwischen C^α und C^m des Porphyringerüsts dar. [154] Sie ist jedoch für die Studien zu Interaktionen von Häm-Peptid-Komplexen nicht sehr aufschlussreich und wurde daher nicht weiter berücksichtigt.

Im Allgemeinen kann festgehalten werden, dass sich die Koordinationszustände der Peptid-Häm-Komplexe mittels Resonanz-Ramanspektroskopie unterscheiden lassen und in Übereinstimmung mit der beobachteten Gruppierung der UV/Vis-Spektren sind. Ergänzend kann gesagt werden, dass speziell im Fall der pentakoordinierten Komplexe ein Wechsel des Koordinationszustandes im Vergleich zu Häm alleine nicht stattfand, aber dennoch Veränderungen in den Spektren beobachtet werden konnten. Diese sind auf Interaktionen des Peptids mit dem Porphyringrundgerüst zurückzuführen. Dennoch erklärt sich hierdurch nicht, welche Parameter im Speziellen eine bestimmte Art der Koordination provozieren. So findet man zwar für verschiedene Peptide (**12**, **23**, **27**) neben dem Cystein in der Sequenz ein weiteres Tyrosin oder Histidin, das ebenfalls das Fe^{III} -Ion des Häm koordinieren könnte, aber dennoch wird ein pentakoordinierter Komplex gebildet. Einen möglichen Einfluss könnte hierbei der Abstand der beiden potentiell koordinierenden Aminosäuren zueinander haben, der in den drei genannten Peptid nicht mehr als eine Aminosäure dazwischen beträgt. Dieser Abstand war bei den beiden hexakoordinierten Peptiden **22** und **28** größer, wenn man die Annahme macht, dass die Koordination des Peptids **22** durch Cystein und Tyrosin zustande kommt. Auf der anderen Seite ist für diese beiden Peptide nicht erkennbar, ob deren Koordination des Hämins durch zwei Liganden aus demselben Peptid oder durch jeweils

einen Liganden aus zweimal dem gleichen Peptid zustande kommt. Um diese Aussagen machen zu können sind tiefergehende, strukturelle Studien mittels NMR-Spektroskopie oder Röntgenkristallstrukturanalyse notwendig. In dieser Arbeit soll als Ausgangspunkt dafür im folgenden Kapitel eine solche Untersuchung für die Peptid-Hämin-Interaktion am Beispiel des Peptids **20** mittels NMR-Spektroskopie präsentiert werden.

5.2.4 NMR-Struktur eines potentiellen HRMs aus Dipeptidylpeptidase 8

Die Untersuchung von Strukturen Häm-bindender Proteine mit HBMs hat Aufschluss über die Konservierung von Aminosäureresten für die permanente Hämbindung in einer Hämbindetasche oder durch kovalente Interaktionen zwischen Proteinen und Häm gegeben. (vgl. Kapitel 2.4.2). [40, 111, 112, 118] Für HRMs ist eine solche Auswertung nicht möglich gewesen, da bisher die notwendigen Strukturen zur Abschätzung relevanter Aminosäuren fehlen. [119] Goodfellow *et al.* charakterisierten mittels NMR-Spektroskopie einen 49 Aminosäuren-langen Sequenzausschnitt aus ALAS1, der Häm über ein Cystein aus einem HRM binden konnte. [128] Dabei fiel für das freie Peptid (untersucht in 50% Trifluorethanol/Wasser) die Bildung eines helikalen Abschnitts auf, der sich über 12 Aminosäuren erstreckte. Untersuchungen für den Komplex aus Peptid und Häm wurden hingegen nur mittels eindimensionaler NMR-Experimente durchgeführt und daher auch keine Struktur abgeleitet. Dennoch ließen sich bereits in diesen Versuchen Verschiebungen von Resonanzen in der Niedrigfeldregion der Protonenspektren beobachten, die vermuten ließen, dass die Bindung von Häm strukturelle Änderung hervorruft. [128] Bisher einziger Vertreter der bekannten Häm-regulierten Proteine, für den es eine Kristallstruktur im Komplex mit Häm gibt, ist Rev-erb β . [75] Das Protein zeigt nach Bindung von Häm eine Konformationsänderung, die sowohl die Aktivität des Proteins erhöht, als auch die Fähigkeit des Proteins generiert, auf zweiatomige Gase (CO, NO) zu reagieren. [75]

Um dieses Repertoire bekannter Vertreter zu erweitern und so mögliche Bindungsmodi für Häm in HRMs, also kurzen Sequenzabschnitten auf der Oberfläche von Proteinen zur Bindung von Häm, zu identifizieren, sollten mittels NMR-Spektroskopie Peptid-Hämin-Komplexe unterschiedlicher Gruppen (vgl. Kapitel 5.2.2) bzw. Klassen (Abb. 24) unter physiologischen Bedingungen etabliert werden. Repräsentativ für die Gruppe 2 bzw. Klasse III wurde in einer ersten Untersuchung Peptid **20** genauer untersucht, das als Häm-reguliertes Motiv aus der humanen Dipeptidylpeptidase 8 (Ser495-Gly517) aus der in Kapitel 5.1.5 dargestellten Datenbankrecherche vorhergesagt wurde.

Zunächst wurde das freie Peptid **20** in Phosphatpuffer mittels NMR-Spektroskopie gemessen. Es zeigte eine geringe Streuung der Amidresonanzen, was auf die Abwesenheit einer vollständig definierten Struktur hindeutete. [137] Mit Ausnahme der Region von

Aminosäure Asp9-Cys12 befanden sich alle Amide in einem Umkreis von 0,25 ppm der chemischen Verschiebungen unstrukturierter Regionen. [156] Das wurde durch die anschließend durchgeführte Analyse der chemischen Verschiebungen der Kohlenstoffatome über den Index für unstrukturierte Regionen bestätigt. [157] Überlagerung der 15 energieminiertesten Strukturen zeigte sowohl in N- als auch in C-terminalen Segmenten konformationelle Ähnlichkeiten. [137] Für den Abschnitt von Gly3 bis Ser8 war sehr wahrscheinlich durch das Vorhandensein der Proline an Position 5 und 7, die nur durch Ala6 getrennt waren, eine strukturell stabilisierte Region zu erkennen. Im C-Terminus formten Glu17 bis Thr21 eine zu einer Kehre ähnliche Struktur, die jedoch weniger gut definiert war. [137] Komplette Statistiken der Strukturen des freien Peptids **20** sowie der im Folgenden untersuchten Komplexe sind in Referenz [137] aufgeführt. Außerdem sind dort die Zuordnungen der Resonanzen des freien Peptids **20** und der untersuchten Komplexe wiederzufinden, im Speziellen auch die nahezu vollständig zugeordneten Resonanzen der Kohlenstoffatome aus den heteronuklearen [^1H , ^{13}C]-HSQC-Spektren bei natürlicher Häufigkeit der jeweiligen Isotope. [137]

Die anschließende Bestimmung des Komplexes aus Peptid **20** und Hämin musste zunächst für die NMR-Spektroskopie optimiert werden. Die Verwendung von paramagnetischem Eisen als Zentralatom des Häms/Hämins führt zu einer Verbreiterung der Banden umliegender mit dem Fe-Ion interagierender sowie benachbarter Aminosäuren und damit zu einer schlechteren Signalintensität. Um dieses Problem zu umgehen, wurden das in den bisherigen Untersuchungen verwendete Hämin gegen Cobalt(III)-Protoporphyrin IX (Co^{III} -Protoporphyrin IX) ausgetauscht. Dabei handelt es sich um einen geeigneten Ersatz, wie zuletzt für ein Co-substituiertes CBS gezeigt werden konnte. [158] Die Messungen mit Co^{III} -Protoporphyrin IX führten im Speziellen für die Aminosäurereste von Cys12 und Ile14 zu einer Signalverbreiterung und verhinderten damit die Zuordnung der dazugehörigen Resonanzen. Da ausgerechnet diese Aminosäuren zentral lagen und speziell für Cys12 die Koordination zum Zentralion postuliert wurde, wurden die Messungen erneut mit Gallium(III)-Protoporphyrin IX (Ga^{III} -Protoporphyrin IX) durchgeführt, das sich als geeigneter Ersatz für Häm bereits in Myoglobin herausstellte. [159] Mit der Hilfe dieses alternativen Metalloprotoporphyrins konnten die Zuordnungen der Resonanzen von Cys12 und Ile14 zum Teil ergänzt werden. [137] Überlagerungen der [^1H , ^{13}C]-HSQC-Spektren von ungebundenem Peptid **20** und Ga^{III} -Protoporphyrin zeigten, dass speziell die $\text{C}^\alpha/\text{H}^\alpha$ - und die $\text{C}^\beta/\text{H}^\beta$ -Resonanzen von Phe10, Lys11 und Cys12 sich deutlich verschieben oder vollständig verschwinden (Abb. 34). Erkennbar ist auch, dass die $\text{C}^\delta/\text{H}^\delta$ -Resonanz von Pro13 durch die Bindung des Ga^{III} -Protoporphyrin IX beeinflusst wird (Abb. 34). Diese Resultate weisen bereits darauf hin, dass die Bindung des Metalloprophyrins IX direkt an das postulierte CP-

Motivs aus der Datenbankrecherche (vgl. Kapitel 5.1.5) erfolgt und darüber hinaus die umgebenden Aminosäuren von Phe10 bis Ile14 mit beeinflusst. [137]

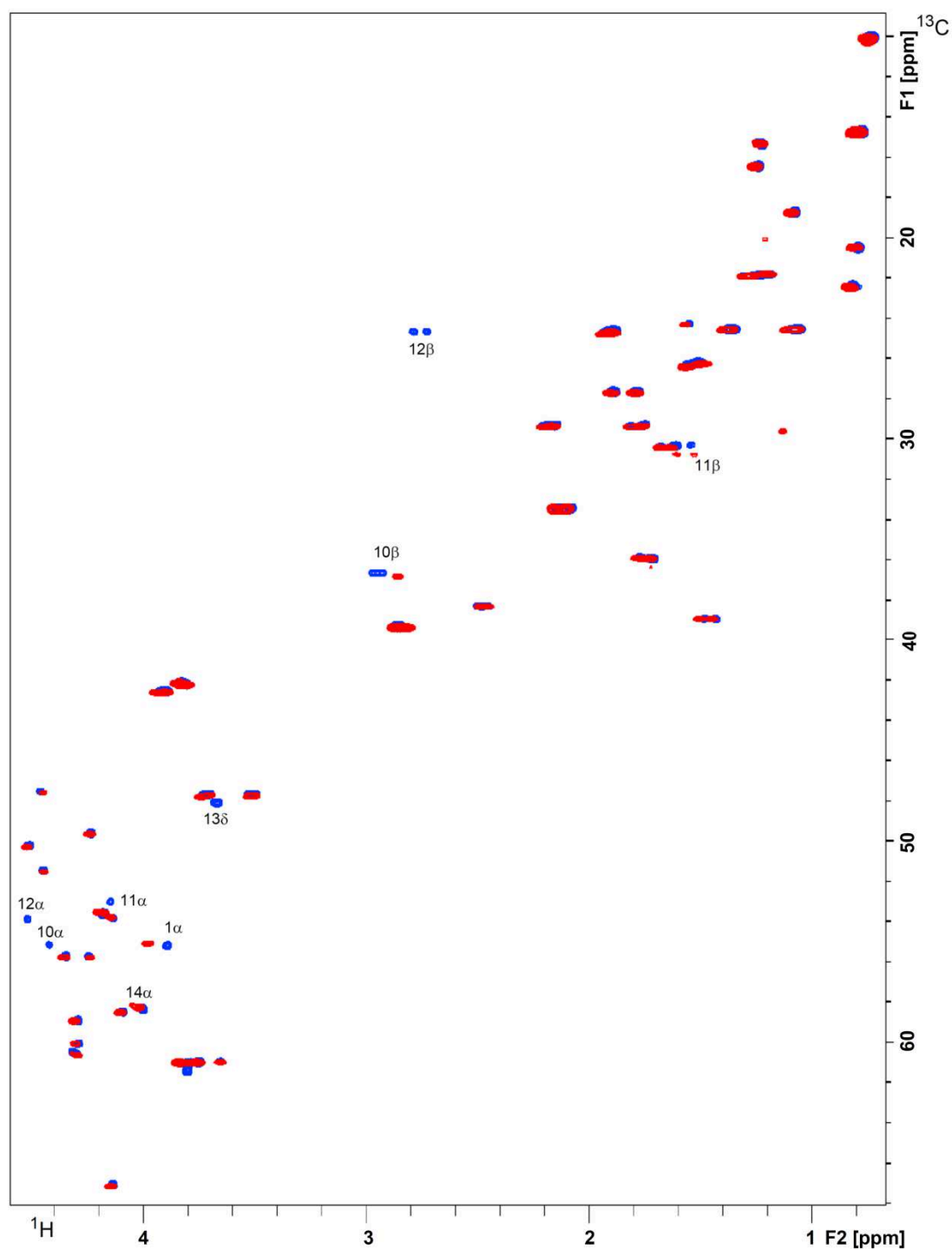


Abb. 34: Überlagerung der $[\text{}^1\text{H}, \text{}^{13}\text{C}]$ -HSQC-Spektren des freien (blau) und des Ga^{III} -Protoporphyrin IX-gebundenen Peptids **20** (rot). Dargestellt sind die C^α - sowie die aliphatische Region. Resonanzen, die sich stark verschieben oder vollständig verschwinden, sind beschriftet. [137]

Mit Hilfe der abgeleiteten Entfernungseinschränkungen, die aus den erhaltenen NOE-Signalen stammten, konnte so eine strukturell detaillierte Version des Komplexes aus Peptid **20** und Ga^{III}-Protoporphyrin IX ermittelt werden (Abb. 35). [137] Die Gesamtflexibilität des Peptids ist im Komplex immer noch gegeben, wie man in Abbildung 35A sehr gut erkennen kann, dennoch kommt es durch Komplexbildung mit Ga^{III}-Protoporphyrin IX zu einer strukturellen Stabilisierung im Bereich der Aminosäuren Phe10 bis Ile14. Durch diese Bindung wird im Peptid eine konformationelle Änderung und Stabilisierung eingeleitet, die zu einer schleifenähnlichen Struktur zwischen den Resten Ser8 und Lys11 führt. Dadurch wird das Peptidrückgrat nahezu in einer Linie mit der C^β-S^γ-Bindung des Cys12 ausgerichtet. Die Konformation des Pro13 ist ebenfalls auffällig. Der Ring der Aminosäure ist parallel zur Hämoberfläche ausgerichtet und ermöglicht damit ausreichend Abstand des weiteren Peptidrückgrats zum Ga^{III}-Protoporphyrin IX (Abb. 35B). Dadurch wird erst ab Ile14 die üblicherweise für Peptide gefundene Flexibilität zurückerlangt. Sowohl der N-Terminus als auch der C-Terminus sind nach Bindung von Ga^{III}-Protoporphyrin IX flexibler und weniger deutlich definiert, wie es für das freie Peptid der Fall war. Die Bindung des Ga^{III}-Protoporphyrins IX würde vermutlich zu sterischen Überschneidungen mit den Enden des Peptids führen. Das strukturell auffällige Motiv von Pro6 bis Pro8 bleibt jedoch erhalten. [137]

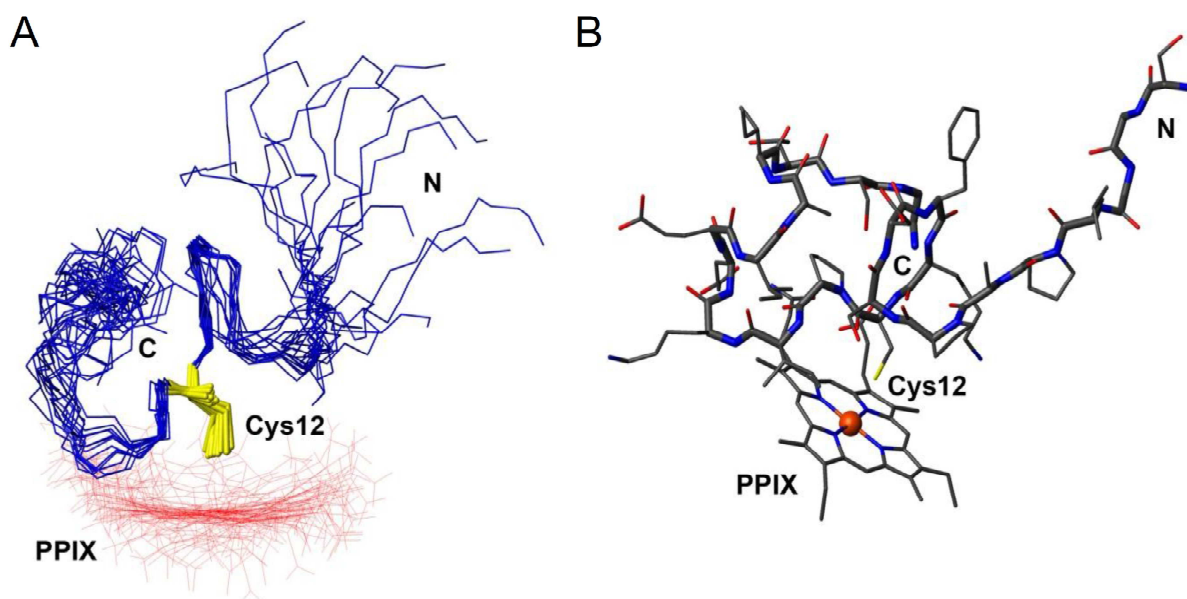


Abb. 35: NMR-Strukturanalysen wurden von Peptid **20** im Komplex mit Ga^{III}-Protoporphyrin IX durchgeführt. (A) Peptidrückgratdarstellung der 15 energieminiertesten Zielstrukturen von Peptid **20** (blau). Dabei ist zu erkennen dass auch das Ga^{III}-Protoporphyrin (rot) unterschiedliche Anordnungen annehmen kann. Das koordinierende Cystein ist gelb markiert. (B) Darstellung der Struktur, die dem Durchschnitt aller Strukturen am nächsten kommt. Die Färbung erfolgte in Abhängigkeit vom Atomtyp. (PPIX, Protoporphyrin IX).

Man erkennt somit deutlich, dass die Bindung von Ga^{III}-Protoporphyrin IX an Peptid **20** zu einer konformationellen Änderung führt, die sich durch eine Umordnung des N-Terminus, eine stärkere Strukturbildung um das CP-Motiv und einen Verlust an definierter Struktur des C-Terminus auszeichnet. Das überschneidet sich mit bisherigen bioinformatischen Studien von Li *et al.*, die die Beobachtung gemacht haben, dass CP-Motive nach dem Prolin eine Krümmung ihrer Struktur aufweisen, die nachfolgende Teile der Sequenzen vom Häm weg ausrichten. [112] Das Modelling eines CP-basierten Peptids mit der Sequenz H-AAACPAAA-OH und anschließendes Docking mit Hämin zeigten ebenfalls Interaktionen des Prolins mit Hämin. [131] Die Induktion konformationeller Änderungen durch Häm ist aber auch bereits für andere Peptide bekannt. [108, 128] In diesem Zusammenhang wird ebenfalls beschrieben, dass Hämin bekannt dafür ist, die Induktion helikaler Strukturen zu bewirken. [108] Dieser Effekt bestätigte sich im Rahmen des untersuchten Peptids **20** jedoch nicht. Dieser Zusammenhang spricht erneut dafür, dass weiterführende strukturelle Untersuchungen mit anderen Peptiden unterschiedlicher Natur notwendig sind, um die verschiedenen Bindungsmodi für sequenziell unterschiedliche HRMs aufzuklären. Über 30 unterschiedliche allgemeine Strukturen für Häm-bindende Proteine mit Häm als permanent gebundener Gruppe sind beschrieben und schließen dabei die bekannten HBMs mit ein. [111, 112] ist zu vermuten, dass sich für HRMs ebenfalls eine solche strukturelle Vielfalt ergibt, die aus Mangel an strukturellen Informationen bisher nicht ausreichend erkannt wurde. Dieser Weg sollte mit der Struktur des 23 Aminosäuren umfassenden Ausschnitts aus Dipeptidylpeptidase 8 beschriftet werden und weitere Untersuchungen stimulieren.

5.3 Vorhersage und Analyse potentieller HRMs

5.3.1 Charakterisierung des Bindemotivs in Dipeptidylpeptidase 8

Mit Hilfe der Daten aus dem Screening einer Peptidbibliothek wurde durch eine Datenbankrecherche eine potentiell neue, bisher unbekannte Hämbindestelle in dem Protein Dipeptidylpeptidase 8 aus *H. sapiens* vorgeschlagen. [136] Es handelt sich dabei um eine Dipeptidylaminopeptidase, die effizient Dipeptide vom N-Terminus eines Proteins oder Peptids nach einem Prolin oder Alanin spalten kann. [160] Eine Verknüpfung zur Aktivierung von T-Zellen sowie zu anderen Immunfunktionen wird diskutiert. [161] Die Einbindung von Hämin als regulatorisches Molekül in Prozesse der Immunantwort wurde bereits im Zusammenhang mit anderen Proteinen diskutiert (vgl. Kapitel 2.2.2). Widersprüchliche oder bisher unzureichende Aussagen z. B. zum Einfluss von Hämin auf die Aktivierung des Komplementsignalwegs [68, 82] oder die Aktivierung der IL-8-Synthese, [83] hinterlassen

hier noch viele ungeklärte Aspekte. Daher wäre DP8 ein interessantes Zielprotein, das durch die Regulation mittels Hämin eventuell in diese Signalwege mit eingreifen könnte.

Um sich dieser Fragestellung zu nähern, wurde analog zu vergleichbaren Studien ein Sequenzausschnitt zwischen ~10 und ~50 Aminosäuren synthetisiert. [53, 55, 127, 128, 131, 132] Da die bisher beschriebenen Vergleichsstudien in Kapitel 5.1.4 mit HBP23 aus hSlo1 als Modellpeptid geführt wurden, erfolgte die Synthese eines Peptids aus DP8 (**20**) nach vergleichbaren Maßstäben (vgl. Kapitel 5.1.5). Das hergestellte, CP-Motiv tragende Peptid wurde erfolgreich auf seine Bindekapazität für Hämin mit einem K_D -Wert von $1,42 \pm 0,24 \mu\text{M}$ getestet (Abb. 29). Diese moderate Bindekapazität ließ sich in Kompetitionsstudien mit hSlo1 als das um Hämin konkurrierende Protein bestätigen (Abb. 30).

Weiterführende Untersuchungen zu strukturellen Aspekten des Peptids ließen nach Durchführung von Resonanz-Raman-Messungen mit Hämin auf eine Pentakoordination des Fe^{III} -Ions Komplex schließen (Abb. 33B). Diese Beobachtung bestätigte sich in den NMR-Messungen zur Analyse des Komplexes mit dem Häminersatz Ga^{III} -Protoporphyrin IX (Abb. 35). Die beschriebene Struktur steht im Gegensatz zu bisher beschriebenen HBMs. Die klassische Einbindung des Häms in Hämbindetaschen, bei denen dieses durch zahlreiche Interaktionen mit dem Protein eine geringe Zugänglichkeit zum Lösungsmittel besitzt, [106] ist hier nicht zu finden. Die Bindung einer umfangreichen Tertiärstruktur findet sich für das Peptid **20** aus Dipeptidylpeptidase 8 erwartungsgemäß nicht. Es fehlen verschiedene Kontakte, wie sie in einer Hämbindetasche gefunden werden. Dieser Mangel an bindungsstärkenden Aminosäuren begründet daher auch die moderate mikromolare Dissoziationskonstante gegenüber klassischen Proteinen mit Hämbindetaschen, deren K_D -Werte im piko- bis femtomolaren Bereich liegen. [25] Da es sich jedoch bei DP8 hier um eine als transient diskutierte Häminbindung im Rahmen der Untersuchung potentieller HRMs handelte, ist nachvollziehbar, dass eine solche Bindung nicht allzu stabil sein kann. Der Prozess der Hämerkennung zur Regulation der Funktion von verschiedenen Proteinen wird in Bezug auf die Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante k_{off} daher mit dramatischen Unterschieden zu klassischen Häm-bindenden Proteinen diskutiert, die Häm als essentielle Gruppe für die Gewährleistung ihrer Funktionalität benötigen (vgl. Kapitel. 2.2.1) Es wird dabei ein Faktor 10^7 für k_{off} als Unterschied zwischen klassischen Hämoproteinen und Häm-erkennenden/Häm-sensorischen Proteinen angesetzt (vgl. Kapitel. 2.2.2, Abb. 7), der deutlich macht, dass für HRMs klassische K_D -Werte, wie sie aus Hämoproteinen oder für HBMs bekannt sind, nicht zum Vergleich geeignet sind. [59]

Diese liegt, wie in Kapitel 5.2.4 bereits angedeutet und hier näher erläutert, in der strukturellen Ausrichtung des Peptids zum Metalloporphyrin begründet. Dabei ist die Rolle des in CP-Motiven konservierten Prolins zur Orientierung anschließender Sequenzabschnitte nicht zu vernachlässigen, wie es bereits zuvor beschrieben wurde (Kapitel 5.2.4). [59, 112,

119] Die dadurch verursachte Ausrichtung des C-terminalen Peptidteils weg vom Metalloporphyrin verringert somit ebenfalls bindungsstabilisierende Effekte und fördert damit die Entstehung einer verringerten Bindungsstabilität von Hämin für das Peptid, die sich im erhaltenen K_D -Wert widerspiegelt. Es handelt sich somit um ein empfindliches Wechselspiel zwischen verschiedenen strukturellen Aspekten, die zunächst die Affinität für Hämin gewährleisten, aber auch gleichzeitig eine "adäquate Instabilität" der Bindung des Hämins provozieren, um so letztlich den regulierenden, reversiblen Effekt der Assoziation mit dem Peptid zu ermöglichen.

5.3.2 Einfluss von Hämin auf die Funktion von Dipeptidylpeptidase 8

Dipeptidylpeptidase 8 als Mitglied der Serinproteasen katalysiert die Hydrolyse von Dipeptiden ausgehend vom N-Terminus seiner Substrate mit einer Spezifität für H-Xaa-Ala/Pro-(Yaa)_n-COOH, wobei Xaa kein Prolin sein darf. [139, 140, 160] Wie im Kapitel zuvor beschrieben, wurde für das aus DP8 abgeleitete Peptid **20** eindeutig die Bindung von Hämin mittels UV/Vis-, Resonanz-Raman- und NMR-Spektroskopie sowie Kompetitionsstudien gegen hSlo1 beschrieben. Dieser Effekt sollte auch auf Proteinebene charakterisiert werden. Dafür wurde ein Enzymtest durchgeführt, bei dem H-Ala-Pro-pNA als Substrat und Hämin als potentieller Effektor eingesetzt wurde (Abb. 36A). [139, 140] Wie in Abbildung 36A (Kasten) gezeigt werden konnte, erfolgte die Spaltung des Substrats durch DP8 nach Michaelis-Menten-Kinetik mit einem K_M -Wert von $226,0 \pm 47,2 \mu\text{M}$ in Übereinstimmung mit bekannten Literaturangaben. [139, 140] Dieses Protokoll wurde anschließend verwendet, um den Einfluss variierender Häminkonzentrationen ($\sim 1 - 100 \mu\text{M}$) auf die Substratumsetzung zu untersuchen (Abb. 36A). Tatsächlich wurde für die Enzymaktivität eine Inhibition durch Hämin mit einem IC_{50} -Wert von $11,5 \pm 1,2 \mu\text{M}$ gefunden. Daher erscheint es sehr wahrscheinlich, dass die Aktivität von DP8 durch die Assoziation mit Hämin reguliert werden kann. Vielversprechend scheint für diese Bindung dabei das umfangreich untersuchte Peptid **20** (Ser495-Gly517) zu sein (vgl. Kapitel 5.3.1).

Da für die NMR-Studien an Peptid **20** Ga^{III} -Protoporphyrin IX eingesetzt wurde, sollte in einer weiteren Messung mit DP8 der Einfluss dieses Metalloporphyrins ebenfalls charakterisiert werden. Mit Hilfe des beschriebenen Ansatzes konnte auch für dieses eine Inhibition der Enzymaktivität beobachtet werden, die mit einem leicht niedrigeren IC_{50} -Wert vergleichbar zu Hämin war ($8,7 \pm 1,8 \mu\text{M}$, Abb. 36B). Damit bestätigte sich Ga^{III} -Protoporphyrin IX auch für DP8 als geeigneter Häminersatz. Inkubationen von DP8 mit Fe^{III} -chlorid zeigten keine Veränderung der Aktivität. Bei Verwendung von Zn^{II} -Protoporphyrin IX und Protoporphyrin IX als Kontrolle wurde ebenfalls ein inhibierender Effekt beobachtet, der aber um einen Faktor ~ 10 signifikant schlechter war als für Hämin. Damit wird bestätigt, dass neben der

koordinierenden Aminosäure weitere Liganden einen Beitrag zur Bindung des Hämins leisten.

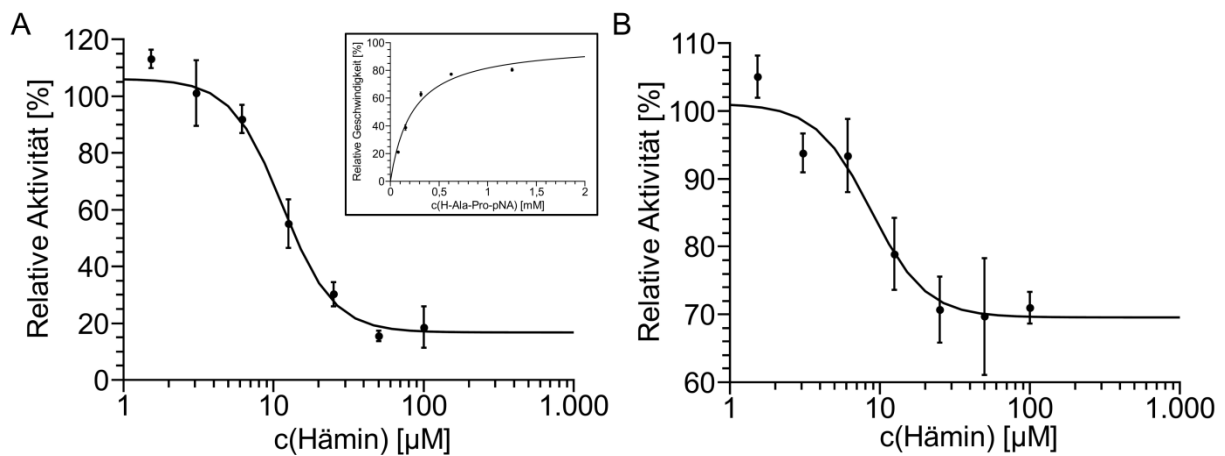


Abb. 36: (A) Die Hämin-abhängige Inhibition der Dipeptidylpeptidase 8 ergibt einen IC_{50} -Wert von $11,5 \pm 1,2 \mu M$. Das Enzym wurde mit 1,6 - 100 μM Hämin versetzt und die Restaktivität (Veränderung der Absorption pro Sekunde) bestimmt. Diese wurde dann auf die Basalaktivität der ungehemmten Kontrolle normalisiert, nachdem der autokatalytische Abbau des Substrats bei 405 nm subtrahiert wurde. Kasten: Die K_M -Wert-Bestimmung der Inkubation des Substrats H-Ala-Pro-pNA mit Dipeptidylpeptidase 8 ergab $226,02 \pm 47,2 \mu M$. (B) Analoge Untersuchungen und Auswertungen für Ga^{III}-Protoporphyrin IX zur Hemmung der Dipeptidylpeptidase 8 ergaben einen IC_{50} -Wert von $8,7 \pm 1,8 \mu M$. [137]

Aus den erhaltenen Ergebnissen zu DP8 lässt sich erkennen, dass Hämin *in vitro* eine inhibierende Wirkung auf das Enzym besitzt. Inwiefern es auch *in vivo* eine Bedeutung für die Regulation der Immunantwort hat (Beeinflussung der T-Zell-Aktivierung und anderer DP8-assoziiierter Prozesse), bleibt ungeklärt (Abb. 37). Dennoch besteht an dieser Stelle mit Hilfe der hier aufgeführten Erkenntnisse großes Potential für die Aufklärung der Regulation des Enzyms durch Hämin.

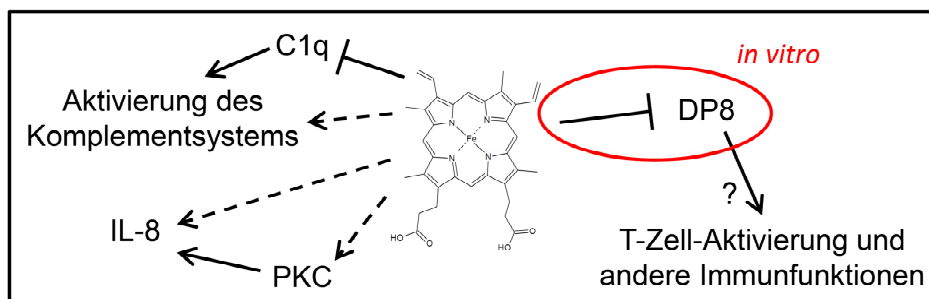


Abb. 37: Einflüsse von Hämin auf Proteine und Prozesse der Immunantwort. DP8 wird u. a. im Zusammenhang mit der Aktivierung von T-Zellen diskutiert und besitzt großes Potential, *in vivo* ein Häm-reguliertes Protein zu sein.

Abschließend kann zu Dipeptidylpeptidase 8 daher festgehalten werden, dass es möglich war, mit den Daten aus einem Screening einer kombinatorischen Peptidbibliothek gegen Häm, den Sequenzausschnitt aus einem Protein vorherzusagen, der vermutlich auch auf Proteinebene eine Regulation seiner Aktivität erfährt. Der dargestellte Ansatz ausgehend von einer Peptidbibliothek liefert somit sehr nützliche Aussagen, um neue potentiell Häm-/Häm-regulierte Proteine und Peptide zu identifizieren.

Für den potentiell Häm-bindenden Sequenzausschnitt aus DP8 konnten eindeutige und umfassend untersuchte Interaktionen mit Häm ermittelt werden. Im Rahmen der erwähnten Klasse III (HRMs) bzw. Gruppe 2 (UV/Vis) erscheint es dadurch ein geeignetes Modellsystem zu sein. Unter Berücksichtigung der Ergebnisse für das gesamte Protein ist daher naheliegend, dass die beobachtete Inhibition der Enzymaktivität durch Bindung von Häm an diesen Sequenzausschnitt des Proteins erfolgen kann. Genauere Aussagen auf Proteinbasis lassen jedoch nur Mutationsstudien oder strukturgebende Untersuchungen wie NMR- und/oder Röntgenkristallstrukturanalyse zu, die für dieses Protein momentan nicht vorliegen.

6 Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Analyse und Vorhersage Häm-regulatorischer Motive (HRM). Dazu wurde eine kombinatorische Peptidbibliothek mit der allgemeinen Sequenz AAXXXX[C/H/Y]XXXXBBBBRM-Linker-Harz (X = 18 proteinogene Aminosäuren außer Cys und Met, inkl. Nle) mit Hämin inkubiert und auf Hämin-bindende Motive gescreent. Für ausgewählte, resynthetisierte Vertreter wurde mittels funktioneller Studien (UV/Vis-Spektroskopie, Kompetitionsstudien mit hSlo1-Kanälen) die Bindung von Hämin an die Peptide quantifiziert. Auf Cys-basierte und im Speziellen Cys-Pro-basierte Sequenzen wurde dabei vorrangig, aber nicht ausschließlich, fokussiert. Weiterführend wurden strukturelle Untersuchungen (Resonanz-Ramanspektroskopie, NMR-Spektroskopie) zu ausgewählten Komplexen aus Hämin und Cys-basierten Sequenzen durchgeführt. Mit Hilfe von Datenbankrecherchen zu den erhaltenen Daten der kombinatorischen Peptidbibliothek konnten Vorhersagen für potentiell Hämin-bindende Proteine gemacht werden. Dipeptidylpeptidase 8 und ein daraus abgeleitetes 23 Aminosäuren-langes Peptid konnten so identifiziert und mittels enzymatischer Studien und den genannten spektroskopischen Methoden in Bezug auf ihre Häminbindung charakterisiert werden.

Das Repertoire Häm-regulierter Proteine ist seit deren Entdeckung zu Beginn der 90er Jahre stetig wachsend und lässt eine größere Vielfalt vermuten als momentan bekannt ist. Zahlreiche Studien setzten ihren Schwerpunkt bisher jedoch auf die Analyse und Identifikation von Hämoproteinen mit Häminbindetaschen. Diese besitzen sogenannte Hämin-bindende Motive, deren Struktur und Sequenz bereits an verschiedenen Beispielen (Cytochrom c, Katalase, Cytochrom P450) intensiv untersucht wurde. Im Gegensatz dazu stehen die bisher weniger bekannten Häm-regulierten Proteine, deren Aktivität reversibel durch Bindung von Häm/Hämin moduliert werden kann. Das Vorhandensein des Häms/Hämins ist jedoch nicht essentiell für die Funktion des Proteins. Sowohl Mangel als auch Überangebot von Häm/Hämin kann unter pathophysiologischen Bedingungen zu schweren Störungen führen, die z. B. im Fall des zerebralen Vasospasmus, der vielfältigen Porphyrinen oder der Alzheimer-Krankheit akute Folgen nach sich ziehen können. Häufig sind dabei Prozesse involviert, die unter der Regulation von Hämin empfindliche Veränderungen in ihrem Ablauf erfahren können.

Eine kleine Anzahl Häm-regulierter Proteine im Gegensatz zu Häm-bindenden Proteinen ist bereits bekannt. Ein klassifizierender Ansatz zu diesen Kandidaten in Bezug auf die Interaktion des Häm/Hämins mit den Proteinen war bisher jedoch nicht möglich, da zu wenige davon im Detail charakterisiert waren. Die Tendenz zur Entdeckung neuer Zielproteine für die Regulation durch Hämin und damit auch deren Einbindung in verschiedene biologische Prozesse ist jedoch steigend und eröffnet inzwischen einen

adäquaten Startpunkt zur klassifizierenden Untersuchung solcher Häm-regulierter Motive. Die aktuelle Studie sollte sich mit dieser Fragestellung beschäftigen und damit einen Beitrag dazu leisten, die Vielfalt der möglichen Häm-bindungen sequenziell und funktionell aufzuklären.

In der vorliegenden Arbeit werden für diese Aufklärung zunächst peptidbasierte Ansätze verfolgt, da die bisher beschriebenen Sequenzen Häm-regulierter Proteine sich auf kurze peptidische Motive beschränken ließen. Es wurden dabei zwei Arbeitsweisen zur Aufklärung der wichtigen Aminosäuren für die Häminbindung verfolgt.

Für Ansatz 1 wurde eine kombinatorische Peptidbibliothek mit Hämin gescreent und die optisch gefärbten Beads gesammelt. Anschließend selektierte Beads wurden auf ihre Sequenz hin untersucht und ließen sich durch Vergleich der einzelnen Sequenzen zunächst auf der Basis der Eisen-koordinierenden Aminosäure unterscheiden. Das besonders hohe Auftreten von Tyrosin und das verstärkte Aufkommen von Cystein im Vergleich zur natürlichen Häufigkeit bestätigten das diskutierte HSAB-Konzept für Hämin. Bei Einsatz von Häm kommt es eventuell zu einer Umverteilung. Diese Untersuchungen hätten jedoch den Rahmen der vorliegenden Arbeit gesprengt. Darüber hinaus konnten für die jeweiligen koordinierenden Aminosäuren in deren Umgebung zum Teil mehr, zum Teil aber auch weniger konservierte Aminosäuren gefunden werden.

In Ansatz 2 wurden die Sequenzen bekannter HRMs, im Speziellen CP-Motive zu einer Konsensussequenz zusammengefasst. Eine Datenbank wurde mittels dieser Sequenz auf potentielle neue Häm-bindende Kandidaten aus dem menschlichen Organismus durchsucht, wobei von den 13 resultierenden Sequenzen nur eine weiter charakterisiert wurde. Darüber hinaus war die erhaltene Konsensussequenz in mehreren Fällen sehr ähnlich bis identisch zu den Untersuchungen an Cys-basierten Sequenzen aus dem 1. Ansatz. Das lässt auf eine Konservierung des ermittelten Motivs in humanen Proteinen schließen.

Ausgewählte Vertreter der Peptidbibliothek sowie daraus vorhergesagte potentiell Häm-bindende Sequenzen abgeleitet aus verschiedenen Proteinen wurden zur Abschätzung der Validität der ermittelten Daten als Nonapeptide neu synthetisiert und auf ihr Bindeverhalten mit Hämin untersucht. Erstmals wurde neben den bekannten UV/Vis-Experimenten die Auswertung solcher Prozesse mittels Wettbewerbsstudien für Hämin in Konkurrenz mit dem humanen Ionenkanalprotein Slo1 beschrieben. Die erhaltenen Ergebnisse verdeutlichen, dass bestimmte Sequenzen unabhängig vom Eisen-koordinierenden Liganden eine höhere Affinität für Hämin besitzen als andere. Bindungsfördernde Einflüsse von Aminosäuren aus der Umgebung zum Hämin sind damit offensichtlich notwendig.

Informationen aus funktionellen Untersuchungen zur Häminbindung an Peptide bestätigten die aus dem Screening der kombinatorischen Peptidbibliothek erhaltenen Spezifitäten. Sinnvoll erschien bei der Einteilung der einzelnen Peptide eine Strukturierung nach der

zentral positionierten, potentiell Häm-kordinierenden Aminosäure, da bereits für Häm-bindende Motive eine solche Unterteilung für einzelne Sequenzmotive abgeleitet wurde (Klasse I - IX). Das Auftreten weiterer möglicher Koordinationsstellen in einem Peptid sollte jedoch nicht außer Acht gelassen werden, da hierdurch andere Bindungsmodi für Häm/Hämin (z. B. Hexakoordination des Häms/Hämins an einem Peptid) entstehen können. Bekannte Häm-regulierte Motive, die auf kurze Sequenzabschnitte beschränkt sind und damit ausgezeichnet durch die untersuchte Peptidbibliothek adressiert werden, sollten in anschließenden Untersuchungen betrachtet und bisherige Erkenntnisse über diese vertieft werden. Da es sich dabei primär um Cystein-basierte Sequenzen handelte, wurden fortführende Studien zunächst auf diese Gruppe Häm-bindender Peptide fokussiert. Dabei zeigten sich repräsentative Kandidaten mit der allgemeinen Sequenz C-X/P-H/F als hochaffin. Aus UV/Vis-Studien ließ sich das Vorhandensein verschiedener Gruppen (1 - 4) in Bezug auf die untersuchten Hämin-Peptid-Komplexe ableiten. Die Gruppe 1 und 2 wiesen dabei eine Verschiebung der Soret-Bande auf, die bathochrom (Verschiebung zu ~420 - 430 nm, Gruppe 1) oder hypsochrom (Verschiebung zu ~370 nm) war. Das Auftreten von zwei Absorptionsmaxima im Bereich der Soret-Bande bei ~370 nm sowie bei ~420 - 430 nm war charakteristisch für Gruppe 3. Eine vierte Gruppe, die bisher nur zwei Vertreter enthielt, zeigte entweder nur eine sehr geringe Affinität für Hämin oder ein vollkommen anderes Verhalten im UV/Vis-Spektrum (z. B. Absorptionsmaximum nicht oder kaum verschoben bei ~400 nm).

Strukturelle Untersuchungen zur Charakterisierung des unterschiedlichen Verhaltens Cys-basierter Peptid-Hämin-Komplexe mittels Resonanz-Ramanspektroskopie bestätigten eine vergleichbare Einteilung in diese Gruppen. Für Peptide der Gruppe 3 ergab sich eine Hexakoordination des Hämins in den jeweiligen Komplexen. Die Gruppen 1 und 2 zeichneten sich durch eine Pentakoordination des Fe^{III} -Ions im Hämin aus, was in Übereinstimmung mit bisherigen Literaturdaten ist.

Die zeitaufwändigen Untersuchungen zur Strukturaufklärung mittels NMR-Spektroskopie wurden ausschließlich für das aus dem Screening der Peptidbibliothek vorhergesagte Häm-regulierte Motiv aus dem Enzym Dipeptidylpeptidase 8 durchgeführt. Das aus den bisherigen Studien abgeleitete Motiv stellte sich als ideales Modellsystem für die Peptide der Klasse III bzw. Gruppe 2 heraus und konnte als erster bekannter Peptid-Hämin-Komplex eines Häm-regulierten Motivs strukturell detailliert charakterisiert werden. Es zeigte sich an Hand dieser Untersuchungen, dass die Bindung von Hämin die Konformation des Peptids entscheidend verändern kann. Eine Stabilisierung der Struktur fand im Speziellen im Bereich des Cysteins als Ligand des zentralen Metallions sowie für Aminosäuren in dessen unmittelbarer Umgebung statt.

Um diesen Einfluss auf die Änderung der Konformation und damit eventuell auch auf die Aktivität für das Protein zu bestätigen, wurde ein funktioneller Enzymtest mit dem vollständigen Enzym Dipeptidylpeptidase 8 durchgeführt. Dieser bestätigte den Einfluss von Hämin und zeigte eine gesenkte Aktivität mit diesem Effektor. Vergleichsstudien mit dem für die NMR-Untersuchungen verwendeten Hämanalogon Ga^{III} -Protoporphyrin IX bestätigten die Übertragbarkeit der Daten aus den NMR-Messungen und lassen vermuten, dass die Bindestelle des Hämins auf der Oberfläche des Proteins Dipeptidylpeptidase 8 in Form des auf Peptidbasis ermittelten HRMs liegt. Perspektivisch werden jedoch strukturelle Untersuchungen für den Komplex aus Hämin und Protein benötigt.

Die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen verdeutlichen Charakteristika Hämin-bindender Sequenzen auf der Basis der Eisen-kordinierenden Aminosäure. Sie stellen den ersten Ansatz zur klassifizierenden Untersuchung Häm-regulierter Motive dar, die aber auch im weiteren Sinne auf Häm-bindende Motive übertragbar sind. Im Rahmen praktisch durchgeführter Untersuchungen repräsentiert diese Studie den bisher einzigen Ansatz und soll damit weiterführende Experimente stimulieren. Für Cys-basierte Peptide konnte eine solche Fokussierung initial durchgeführt werden und bestätigte basierend auf spektroskopischen Daten die Notwendigkeit einer weiteren Unterteilung. Als erster Vertreter für ein Enzym, das potentiell ein Cys-basiertes HRM besitzt, konnte die Bindung an Dipeptidylpeptidase 8, einem Enzym, das in die Immunantwort involviert ist, vorhergesagt werden. Die Bindung von Hämin verursachte eine Hemmung der Proteaseaktivität des Enzyms. Damit ließ sich die Übertragbarkeit der Daten aus dem Screening der kombinatorischen Peptidbibliothek auf Proteinebene validieren und deren Anwendbarkeit für die Vorhersage weiterer potentiell Häm-regulierter Proteine untermauern.

Diese Arbeit liefert damit einen entscheidenden Beitrag zur Aufklärung der Interaktion von Häm mit Häm-regulierten Motiven und ermöglicht darüber die Vorhersage von Sequenzen in Proteinen, die die Bindung von Hämin stimulieren können. Das kann zahlreiche Studien, wie die zum Teil wahllose Mutation jeglicher Eisen-kordinierender Aminosäuren aus Häm-regulierten Proteinen durch Berücksichtigung des unmittelbaren Umfelds erleichtern und so zu einer zuverlässigeren Bestimmung der Hämbindestellen führen. Die Regulation durch Hämin findet in zahlreichen Prozessen wie dem Proteinabbau, der Immunantwort, der Ionenkanalaktivität und der Transkriptions-regulation statt. Die in dieser Arbeit ermittelten Befunde lassen damit die Aussage zu, dass diese Auflistung noch lange nicht erschöpft ist und die physiologische und pathophysiologische Rolle von Häm für Proteine potentiell eine noch größere Ausweitung erfahren wird.

7 Summary

The present thesis is dedicated to the analysis and prediction of heme-regulatory motifs (HRM). For this reason, a peptide library with the sequence AAXXXX[C/H/Y]XXXXBBBBRM-linker-resin (X = 18 proteinogenic amino acids except Cys and Met, including Nle) was incubated with hemin and screened for motifs which bind hemin. In functional studies (UV/Vis spectroscopy, competition studies with Slo1 channels) for selected, resynthesized representatives binding to hemin was calculated. Research was focused on Cys-based and especially Cys-Pro-based peptides but not exclusively. Subsequent structural studies (resonance-Raman spectroscopy, NMR spectroscopy) were performed for hemin-peptide-complexes based on Cys-containing sequences. Data obtained from the screening were used to predict potential heme-binding proteins with the help of databases. Dipeptidyl peptidase 8 and a derived 23-mer peptide were identified by this approach and characterized for its heme-binding potential with respect to enzymatic assays and spectroscopic methods.

Increasing numbers of heme-regulated proteins are known since their discovery in the beginning of the 90's, i., e., a larger variety can be expected from future studies. Several studies focused on the analysis and identification of hemoproteins containing a special heme-binding pocket. These pockets consist of so-called heme-binding motifs for which structural and sequential features were intensively investigated as can be exemplified with cytochrome c, catalase, and cytochrome P450. In contrast, heme-regulatory motifs are responsible for reversibly binding heme, and may, in this way, mediate a functional change of the respective protein. However, the presence of heme/hemin is not necessary for these proteins to fulfill their proper function. A lack as well as excess amounts of heme may lead to severe dysfunctions in pathophysiological conditions found in diseases such as cerebral vasospasm, porphyria or Alzheimer's disease. In these cases, heme-regulated processes can be changed by differing levels of free heme.

Compared to heme-binding proteins/hemoproteins a small number of heme-regulated is known. In the past, a classification of the latter was not possible which was mainly due to the lack of detailed studies for a sufficient number of proteins. The tendency for the identification of new heme-regulated target proteins and their relevance in different biological pathways is increasing, and thus represents a suitable starting point for classifying and defining heme-regulatory motifs in more detail.

In the present thesis, peptide-based systems were used to approach this aim, because the interactions so far known for heme-binding in heme-regulated proteins can be limited to short sequence lengths. Two different approaches were applied to identify important amino acids for the heme-association event:

1. A combinatorial peptide library was screened for heme binding by collecting stained beads indicating binding of heme. Subsequently, sequences of selected beads were identified and classified with respect to their iron-coordinating amino acid. The large appearance of tyrosine for these sequences and the rather high amount of cysteine in contrast to natural abundance confirmed the HSAB-concept for the use of heme. Usage of heme might lead to a slightly different distribution, but no significant deviation. Furthermore, for each iron-coordinating amino acid distinct positions in their surroundings showed more or less obvious preferences for certain amino acids.

2. Sequences of known HRMs, especially CP-motifs were analyzed to derive a consensus sequence which was used for a database screening to search for potential new heme-binding proteins of human origin. The search resulted in 13 sequences, out of which one representative was selected for further characterization. Moreover, the determined consensus sequence was similar – if not identical – to the results for Cys-based sequences of the first approach indicating a conservation of these motifs in human proteins.

Selected representatives from the peptide library approach as well as predicted potential heme-binding sequences were resynthesized as nonapeptides to validate the obtained results from the screening and to investigate their capacity to bind heme. Beside UV/Vis studies, a heme-binding competition assay using human potassium ion channel protein Slo1 was applied for the first time in this work. Herein, peptides compete with the protein for heme binding which can also be used to evaluate the binding capacities these peptides. In the course of this experiment sequences with a higher affinity for heme compared to other samples were identified, although these contained the same iron-coordinating amino acid. This clearly demonstrated the impact of the surrounding amino acids on the association of the peptides with heme.

The obtained specificities from the screening of a combinatorial peptide library were thus confirmed by functional assays. A classification of the peptides according to the central coordinating amino acid as already considered for the known heme-binding motifs seemed reasonable (classes I - IX). The appearance of further possibly coordinating amino acids in one peptide was also taken into consideration in order to account for other binding modes for heme/heme (e. g. hexacoordination of heme/heme by one peptide).

Known heme-regulatory motifs were also reduced to short sequence stretches to address the idea to obtain a more detailed structural and functional knowledge about these occurring in natural proteins. Due to the fact that these sequences were mainly cysteine-based, additional studies were performed based on respective cysteine-containing peptides. High affinity binding peptides turned out to contain the general sequence motif C-X/P-H/F. From UV/vis studies of all Cys-containing peptides different groups (1 - 4) with respect to their heme-binding behaviour were observed. Group 1 and 2 showed a shift of the Soret-band to

~420-430 nm or ~370 nm, respectively. The appearance of two absorption maxima in the region of the Soret-band at ~370 nm and ~420-430 nm were specific for group 3. A fourth group which contained only 2 representatives displayed low binding affinity for hemin or a completely different absorption spectrum (absorption maximum showed none or a small shift of the Soret-band to ~400 nm).

Structural characterization of Cys-based peptide-hemin-complexes applying resonance-Raman spectroscopy confirmed similar groups as observed for UV/Vis studies. For peptides from group 3 a hexacoordination of hemin was found. Group 1 and 2 contained representatives for a pentacoordination of the Fe^{III}-ion within hemin, which confirmed recent literature reports.

Time-consuming measurements using NMR spectroscopy and Ga^{III}-protoporphyrin IX as hemin surrogate were only performed for the heme-regulatory motif predicted in the enzyme dipeptidyl peptidase 8. The derived sequence motif turned out to be a suitable model for peptides of class III (peptide library) and group 2 (UV/Vis spectroscopy). It is the first peptide-hemin-complex of a heme-regulatory motif that was structurally analyzed. These NMR studies revealed that binding of hemin to the peptide drastically changes the peptide's conformation. A stabilization of the peptide's structure was found especially for cysteine as the axial hemin-ligand and its surrounding amino acids.

To confirm this influence on changes in conformation upon hemin application and in turn the protein's activity, an enzymatic assay using the full-length dipeptidyl peptidase 8 was performed. Influences of hemin as the effector on the protein level showed an inhibition of the enzyme's activity and in this way confirmed its impact on the protein level. Studies applying Ga^{III}-protoporphyrin IX led to comparable results as found for hemin. This indicates that the results obtained for the dipeptidyl peptidase 8 derived peptide from NMR structural analysis can indeed be transferred to the protein level, however, the binding region on the protein surface can not be determined by this approach. Here structural analysis of the protein in complex with hemin is required perspectively.

The herein performed investigations show a characterization of heme-binding sequences based on the iron-coordinating amino acid. This is the first approach for classifying heme-regulatory motifs and can also be applied for heme-binding motifs, though, limitations concerning structural aspects need to be taken into account. However, the study represents the first approach in this direction and may stimulate further experiments. It has been shown that the initial studies on Cys-based peptides performed herein confirmed the necessity of classifying heme-binding motifs. As a first representative for an enzyme that contains a potential HRM dipeptidyl peptidase 8, involved in immune response, was predicted. Binding of hemin caused inhibition of the protease activity and confirmed the approach starting from truncated peptide sequence models to full-length functional proteins.

The present thesis thus gives valuable information about the interaction of heme and heme-regulatory motifs and in this way allows for the prediction of sequences in proteins that may be able to bind to heme. Complex studies such as random mutations of any potential iron-coordinating amino acid might be restricted if not completely prevented by taking into account the herein reported heme-recognition requirements to more reliably predicting a certain heme-binding position. Regulation by heme takes place in several processes such as protein degradation, immune response, ion channel activity and transcription regulation. The presented results of this thesis give rise to the complexity and variability of further processes that might be relevant for heme-regulatory interactions illustrating that physiological and pathophysiological functions for heme are still to be explored.

8 Abkürzungsverzeichnis

Die Abkürzungen für Aminosäuren und deren Derivate wurden entsprechend den Empfehlungen des Nomenclature Committee of IUB (NC-IUB) und der IUPAC-IUB Joint Commission on Biochemical Nomenclature (JCBN) verwendet. [162] Die Aminosäuren und Aminosäurederivate liegen in der L-Konfiguration vor.

5-ALA	5-Aminolävulinsäure
A β	Amyloid- β -Protein
A β PP	Amyloid- β -Vorläuferprotein
ALAD	ALA-Dehydratase
ALAS1	nicht-spezifische Aminolävulinatsynthase
ALAS2	erythrozytenspezifischen Aminolävulinatsynthase
ArgRS	Arginyl-tRNA-Synthetase
ATE1	Arginyltransferase
Bmal1	Brain and muscle ARNT-like 1
Boc	<i>tertiär</i> -Butyloxycarbonyl
BOX A, BOX B	Bilirubinoxidationsprodukt A, Bilirubinoxidationsprodukt B
CAP	catabolite activator protein
CBS	Cystathionin- β -Synthase
Cdk1	Cyclin dependent kinase 1
Cdk4	Cyclin dependent kinase 4
CRP	C-reactive protein
Cry	Cryptochrom
D ₂ O	deutერიertes Wasser
DC	Dünnschichtchromatographie
DCM	Dichlormethan
DGCR8	DiGeorge-Syndrom-kritische-Region-8-Protein
DIEA	Diisopropylethylamin
DMF	Dimethylformamid
DP8	Dipeptidylpeptidase 8
DQF-COSY	double quantum filtered correlated spectroscopy
eIF2 α	eukaryotischer Initiationsfaktor 2 α
eIF2(α P)	phosphorylierter eukaryotischer Initiationsfaktor 2 α
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
ER	endoplasmatisches Retikulum
ERK1/2	extracellular signal-regulated kinase 1/2

ERK1/2-P	phosphorylierte extracellular signal-regulated kinase 1/2
E-Selektin	endotheliales Leukozytenadhäsionsmolekül
Fmoc	9-Fluorenylmethoxycarbonyl
feoB	ferrous iron transport protein B
HAP1	Heme activator protein 1
HBM	Häm-bindendes Motiv
HBP23	heme binding peptide, 23 Aminosäurereste
HBTU	2-(1H-Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethylguanidiniumhexafluorophosphat
hEAG1	humaner Ether-a-go-go-Kaliumionenkanal 1
HOBt	N-Hydroxybenzotriazol
hPer2	humanes Period-2
HPLC	high performance/pressure liquid chromatography
HRI	Häm-regulierter Inhibitor
HRI-P	phosphoryliertes HRI
HRM	Häm-regulatorisches Motiv
HO-1, HO-2	Hämoxygenase-1, Hämoxygenase-2
HSAB	Hard-Soft Acid-Base
HSQC	heteronuclear single quantum coherence
hSlo1	humaner großer Calcium- und spannungsgesteuerter Kaliumionenkanal
IC ₅₀	halbmaximale inhibitorische Konzentration
ICAM-1	intrazelluläres Adhäsionsmolekül/-protein 1
IL-36 α	Interleukin-36 α
IL-8	Interleukin-8
IRE	Iron-responsive elements
IRP2	Iron-regulatory proteins 2
IgG	Immunglobulin G
Irr	Iron-response-regulator
Jak2	Janus kinase 2
K _D	Dissoziationskonstante
k _{off}	Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante
Kv	spannungsgesteuerter Kaliumionenkanal
MALDI-TOF	Matrix-Assistierte Laser Desorption/Ionisation
MAPK	Mitogen-aktivierten-Proteinkinase-Signalweg
MARE	Maf-Erkennungs-Elemente
MEK1/2	MAPK/ERK Kinase 1/2

MEK1/2-P	phosphorylierte MAPK/ERK Kinase 1/2
MVM	4-Methyl-3-vinylmaleimid
M _w (th.)	Molekulargewicht (theoretisch)
NGF	Nervenwachstumsfaktor
Nic-OSu	Nicotinsäuresuccinimidester
NMM	N-Methylmorpholin
NOESY	nuclear overhauser and enhancement spectroscopy
NPAS2	neuronaes-PAS-Protein 2
O ^t Bu	<i>tertiär</i> -Butylester
PAS	Per-Arnt-Sim
Pbf	2,2,4,6,7-Pentamethyl-dihydrobenzofuran-5-sulfonyl
PBGD	Porphobilinogen-Deaminase
PED-MS	partieller Edman-Abbau gekoppelt mit Massenspektrometrie
Per2	Period-2
PITC	Phenylisothiocyanat
PKC	Proteinkinase C-Aktivierung
PPIX	Protoporphyrin IX
PTP1B	Proteintyrosinphosphatase 1B
Raf-P	phosphoryliertes Raf
R _f	Retardationsfaktor
ROESY	rotating-frame nuclear overhauser enhancement spectroscopy
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
RP	reversed-phase
RTK	Rezeptortyrosinkinasen
SAB	Subarachnoidalblutungen
STC1, STC2	Stanniocalcin 1, Stanniocalcin 2
tBu	<i>tertiär</i> -Butyl
TFA	Trifluoressigsäure
t _R	Retentionszeit
TOCSY	total correlated spectroscopy
Trt	Trityl
VCAM-1	vaskuläres Zelladhäsionsmolekül/-protein

9 Literaturverzeichnis

1. Zhang, L. (2011) *Heme biology : the secret life of heme in regulating diverse biological processes*, World Scientific, Singapore; Hackensack, NJ.
2. Moss, G. P. (1987) Nomenclature of Tetrapyrroles, *Pure Appl Chem* 59, 779-832.
3. Livingston, D. A., Pfaltz, A., Schreiber, J., Eschenmoser, A., Ankelfuchs, D., Moll, J., Jaenchen, R., Thauer, R. K. (1984) Factor-F430 from Methanogenic Bacteria - Structure of the Protein-Free Factor, *Helv Chim Acta* 67, 334-351.
4. Mennenga, A. (2007) Einlagerung von Häm, Chlorophyll- und Bakteriochlorophyllderivaten in de novo synthetisierte Peptide als Modellsysteme natürlicher Protein-Kofaktor-Komplexe, *Dissertation, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf*.
5. Li, Y., Zhang, L. (2011) The chemical and structural bases of heme recognition, in *Heme biology : the secret life of heme in regulating diverse biological processes* (Zhang, L., Ed.), Kapitel 8, World Scientific, Singapore; Hackensack, NJ.
6. Munro, A. W., Girvan, H. M., McLean, K. J., Cheesman, M. R., Leys, D. (2009) Heme and Hemoproteins, in *Tetrapyrroles : birth, life, and death* (Warren, M. J., Smith, A. G., Eds.), Kapitel 10, Landes Bioscience; Springer Science+Business Media, Austin, Tex.; New York.
7. Timkovich, R., Cork, M. S., Gennis, R. B., Johnson, P. Y. (1985) Proposed Structure of Heme-D, a Prosthetic Group of Bacterial Terminal Oxidases, *J Am Chem Soc* 107, 6069-6075.
8. Gouterman, M., Snyder, L. C., Wagniere, G. H. (1963) Spectra of Porphyrins Part II. Four Orbital Model, *J Mol Spectrosc* 11, 108-127.
9. Platt, J. R. (1956) Electronic structure and excitation of polyenes and porphyrins, in *Radiation Biology Vol. III* (Hollaender, A., Ed.), Kapitel 2, McGraw-Hill, New York.
10. Soret, J.-L. (1883) Analyse spectrale: Sur le spectre d'absorption du sang dans la partie violette et ultra-violette, *Comptes rendus de l'Académie des sciences* 97, 1269-1270.
11. Braterman, P. S., Davies, R. C., Williams, R. J. P. (1964) *The properties of metal-porpyhrin and similar complexes*, London, Interscience.
12. Bolster, M. W. G. d. (1997) Glossary of terms used in bioinorganic chemistry IUPAC recommendations, *Pure Appl Chem* 69, 1251-1303.
13. Rubio, M., Roos, B. O., Serrano-Andres, L., Merchan, M. (1999) Theoretical study of the electronic spectrum of magnesium-porphyrin, *J Chem Phys* 110, 7202-7209.

14. Oliveira, K. M. T., Trsic, M. (2001) Comparative theoretical study of the electronic structures and electronic spectra of Fe²⁺-, Fe³⁺-porphyrin and free base porphyrin, *J Mol Struc-Theochem* 539, 107-117.
15. Marcelli, A., Badovinac, I. J., Orlic, N., Salvi, P. R., Gellini, C. (2013) Excited-state absorption and ultrafast relaxation dynamics of protoporphyrin IX and hemin, *Photoch Photobio Sci* 12, 348-355.
16. Shack, J., Clark, W. M. (1947) Metalloporphyrins 6. Cycles of Changes in Systems Containing Heme, *J Biol Chem* 171, 143-187.
17. Zhang, L. (2011) Introduction, in *Heme biology : the secret life of heme in regulating diverse biological processes* (Zhang, L., Ed.), Kapitel 1, World Scientific, Singapore; Hackensack, NJ.
18. Kidd, R. D., Baker, H. M., Mathews, A. J., Brittain, T., Baker, E. N. (2001) Oligomerization and ligand binding in a homotetrameric hemoglobin: two high-resolution crystal structures of hemoglobin Bart's (gamma(4)), a marker for alpha-thalassemia, *Protein Sci* 10, 1739-1749.
19. Park, S. Y., Yokoyama, T., Shibayama, N., Shiro, Y., Tame, J. R. (2006) 1.25 Å resolution crystal structures of human haemoglobin in the oxy, deoxy and carbonmonoxy forms, *J Mol Biol* 360, 690-701.
20. Inaba, K., Ishimori, K., Morishima, I. (1998) Structural and functional roles of heme binding module in globin proteins: identification of the segment regulating the heme binding structure, *J Mol Biol* 283, 311-327.
21. Pesce, A., Dewilde, S., Nardini, M., Moens, L., Ascenzi, P., Hankeln, T., Burmester, T., Bolognesi, M. (2003) Human brain neuroglobin structure reveals a distinct mode of controlling oxygen affinity, *Structure* 11, 1087-1095.
22. Smagghe, B. J., Hoy, J. A., Percifield, R., Kundu, S., Hargrove, M. S., Sarath, G., Hilbert, J. L., Watts, R. A., Dennis, E. S., Peacock, W. J., Dewilde, S., Moens, L., Blouin, G. C., Olson, J. S., Appleby, C. A. (2009) Correlations Between Oxygen Affinity and Sequence Classifications of Plant Hemoglobins, *Biopolymers* 91, 1083-1096.
23. Müller-Esterl, W. (2004) Dynamik sauerstoffbindender Proteine, in *Biochemie - Eine Einführung für Mediziner und Naturwissenschaftler*, Kapitel 10, Spektrum Akademischer Verlag, München.
24. Hou, S., Reynolds, M. F., Horrigan, F. T., Heinemann, S. H., Hoshi, T. (2006) Reversible binding of heme to proteins in cellular signal transduction, *Acc Chem Res* 39, 918-924.

25. Igarashi, J., Kitanishi, K., Martinkova, M., Murase, M., Iizuka, A., Shimizu, T. (2008) The roles of thiolate-heme proteins, other than the P450 cytochromes, in the regulation of heme-sensor proteins, *Acta Chim Slov* 55, 67-74.
26. Aono, S. (2003) Biochemical and biophysical properties of the CO-sensing transcriptional activator CooA, *Accounts Chem Res* 36, 825-831.
27. Ascenzi, P., Bocedi, A., Leoni, L., Visca, P., Zennaro, E., Milani, M., Bolognesi, M. (2004) CO sniffing through heme-based sensor proteins, *IUBMB Life* 56, 309-315.
28. Evande, R., Ojha, S., Banerjee, R. (2004) Visualization of PLP-bound intermediates in hemeless variants of human cystathionine beta-synthase: evidence that lysine 119 is a general base, *Arch Biochem Biophys* 427, 188-196.
29. Poulos, T. L. (2006) Soluble guanylate cyclase, *Curr Opin Struct Biol* 16, 736-743.
30. Baranano, D. E., Snyder, S. H. (2001) Neural roles for heme oxygenase: Contrasts to nitric oxide synthase, *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 10996-11002.
31. Ingi, T., Cheng, J., Ronnett, G. V. (1996) Carbon monoxide: An endogenous modulator of the nitric oxide-cyclic GMP signaling system, *Neuron* 16, 835-842.
32. Tejero, J., Santolini, J., Stuehr, D. J. (2009) Fast ferrous heme-NO oxidation in nitric oxide synthases, *FEBS J* 276, 4505-4514.
33. Wang, J. L., Rousseau, D. L., Abusoud, H. M., Stuehr, D. J. (1994) Heme Coordination of NO in NO Synthase, *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 10512-10516.
34. Meunier, B., de Visser, S. P., Shaik, S. (2004) Mechanism of oxidation reactions catalyzed by cytochrome P450 enzymes, *Chem Rev* 104, 3947-3980.
35. Shaik, S., Kumar, D., de Visser, S. P., Altun, A., Thiel, W. (2005) Theoretical perspective on the structure and mechanism of cytochrome P450 enzymes, *Chem Rev* 105, 2279-2328.
36. Smith, A. T., Veitch, N. C. (1998) Substrate binding and catalysis in heme peroxidases, *Curr Opin Chem Biol* 2, 269-278.
37. Lederer, F. (1994) The cytochrome b5-fold: an adaptable module, *Biochimie* 76, 674-692.
38. Guo, F. (2011) Heme and microRNA biogenesis, in *Heme biology : the secret life of heme in regulating diverse biological processes* (Zhang, L., Ed.), Kapitel 6, World Scientific, Singapore; Hackensack, NJ.
39. Nelson, D. R., Kamataki, T., Waxman, D. J., Guengerich, F. P., Estabrook, R. W., Feyereisen, R., Gonzalez, F. J., Coon, M. J., Gunsalus, I. C., Gotoh, O., Okuda, K., Nebert, D. W. (1993) The P450 Superfamily - Update on New Sequences, Gene-Mapping, Accession Numbers, Early Trivial Names of Enzymes, and Nomenclature, *DNA Cell Biol* 12, 1-51.

40. Welinder, K. G. (1992) Superfamily of plant, fungal and bacterial peroxidases, *Curr Opin Struc Biol* 2, 388–393.
41. DePillis, G. D., Sishta, B. P., Mauk, A. G., Ortiz de Montellano, P. R. (1991) Small substrates and cytochrome c are oxidized at different sites of cytochrome c peroxidase, *J Biol Chem* 266, 19334-19341.
42. Derat, E., Shaik, S., Rovira, C., Vidossich, P., Alfonso-Prieto, M. (2007) The effect of a water molecule on the mechanism of formation of compound 0 in horseradish peroxidase, *J Am Chem Soc* 129, 6346-6347.
43. Alfonso-Prieto, M., Biarnes, X., Vidossich, P., Rovira, C. (2009) The molecular mechanism of the catalase reaction, *J Am Chem Soc* 131, 11751-11761.
44. Lad, L., Schuller, D. J., Shimizu, H., Friedman, J., Li, H., Ortiz de Montellano, P. R., Poulos, T. L. (2003) Comparison of the heme-free and -bound crystal structures of human heme oxygenase-1, *J Biol Chem* 278, 7834-7843.
45. Müller-Esterl, W. (2004) Biosynthese von Aminosäuren und Häm, in *Biochemie - Eine Einführung für Mediziner und Naturwissenschaftler*, Kapitel 44, Spektrum Akademischer Verlag, München.
46. Yokota, T., Nakajima, Y., Yamakura, F., Sugio, S., Hashimoto, M., Takamiya, S. (2006) Unique structure of *Ascaris suum* b(5)-type cytochrome: an additional alpha-helix and positively charged residues on the surface domain interact with redox partners, *Biochem J* 394, 437-447.
47. Reid, L. S., Lim, A. R., Mauk, A. G. (1986) Role of Heme Vinyl Groups in Cytochrome-B5 Electron-Transfer, *J Am Chem Soc* 108, 8197-8201.
48. Yantsevich, A. V., Gilep, A. A., Usanov, S. A. (2008) Mechanism of Electron Transfer in Fusion Protein Cytochrome b(5)-NADH-cytochrome b(5) Reductase, *Biochemistry (Mosc.)* 73, 1096-1107.
49. Tabacchi, G., Zucchini, D., Caprini, G., Gamba, A., Lederer, F., Vanoni, M. A., Fois, E. (2009) L-Lactate dehydrogenation in flavocytochrome b(2) - A first principles molecular dynamics study, *FEBS J* 276, 2368-2380.
50. Mauk, A. G., Mauk, M. R., Moore, G. R., Northrup, S. H. (1995) Experimental and theoretical analysis of the interaction between cytochrome c and cytochrome b5, *J Bioenerg Biomembr* 27, 311-330.
51. Sassa, S. (2004) Why heme needs to be degraded to iron, biliverdin IXalpha, and carbon monoxide?, *Antioxid Redox Signal* 6, 819-824.
52. Chernova, T., Smith, A. G. (2011) Role of heme in brain functions, in *Heme biology : the secret life of heme in regulating diverse biological processes* (Zhang, L., Ed.), Kapitel 5, World Scientific, Singapore; Hackensack, NJ.

53. Tang, X. D., Xu, R., Reynolds, M. F., Garcia, M. L., Heinemann, S. H., Hoshi, T. (2003) Haem can bind to and inhibit mammalian calcium-dependent Slo1 BK channels, *Nature* 425, 531-535.
54. Ishikawa, H., Kato, M., Hori, H., Ishimori, K., Kirisako, T., Tokunaga, F., Iwai, K. (2005) Involvement of heme regulatory motif in heme-mediated ubiquitination and degradation of IRP2, *Mol Cell* 19, 171-181.
55. Zhang, L., Guarente, L. (1995) Heme Binds to a Short Sequence That Serves a Regulatory Function in Diverse Proteins, *EMBO J* 14, 313-320.
56. Yang, J., Kim, K. D., Lucas, A., Drahos, K. E., Santos, C. S., Mury, S. P., Capelluto, D. G., Finkielstein, C. V. (2008) A novel heme-regulatory motif mediates heme-dependent degradation of the circadian factor period 2, *Mol Cell Biol* 28, 4697-4711.
57. Lathrop, J. T., Timko, M. P. (1993) Regulation by heme of mitochondrial protein transport through a conserved amino acid motif, *Science* 259, 522-525.
58. Hu, R. G., Wang, H. Q., Xia, Z. X., Varshavsky, A. (2008) The N-end rule pathway is a sensor of heme, *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 76-81.
59. Shimizu, T. (2012) Binding of cysteine thiolate to the Fe(III) heme complex is critical for the function of heme sensor proteins, *J Inorg Biochem* 108, 171-177.
60. Zhang, L., Sessoms, R. (2011) Heme biosynthesis and degradation, in *Heme biology : the secret life of heme in regulating diverse biological processes* (Zhang, L., Ed.), Kapitel 2, World Scientific, Singapore; Hackensack, NJ.
61. Munakata, H., Sun, J. Y., Yoshida, K., Nakatani, T., Honda, E., Hayakawa, S., Furuyama, K., Hayashi, N. (2004) Role of the heme regulatory motif in the heme-mediated inhibition of mitochondrial import of 5-aminolevulinate synthase, *J Biochem* 136, 233-238.
62. Eisenstein, R. S. (2000) Iron regulatory proteins and the molecular control of mammalian iron metabolism, *Annu Rev Nutr* 20, 627-662.
63. Girvan, H. M., Munro, A. W. (2013) Heme sensor proteins, *J Biol Chem* 288, 13194-13203.
64. Small, S. K., Puri, S., O'Brian, M. R. (2009) Heme-dependent metalloregulation by the iron response regulator (Irr) protein in Rhizobium and other Alpha-proteobacteria, *Biomaterials* 22, 89-97.
65. Qi, Z. H., Hamza, I., O'Brian, M. R. (1999) Heme is an effector molecule for iron-dependent degradation of the bacterial iron response regulator (Irr) protein, *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 13056-13061.
66. Yi, L., Ragsdale, S. W. (2007) Evidence that the heme regulatory motifs in heme oxygenase-2 serve as a Thiol/Disulfide redox switch regulating heme binding, *J Biol Chem* 282, 21056-21067.

67. Müller-Esterl, W. (2004) Signaltransduktion über enzymgekoppelte Rezeptoren, in *Biochemie - Eine Einführung für Mediziner und Naturwissenschaftler*, Kapitel 30, Spektrum Akademischer Verlag, München.
68. Wagener, F. A., van Beurden, H. E., von den Hoff, J. W., Adema, G. J., Figdor, C. G. (2003) The heme-heme oxygenase system: a molecular switch in wound healing, *Blood* 102, 521-528.
69. Mense, S. M., Zhang, L. (2006) Heme: a versatile signaling molecule controlling the activities of diverse regulators ranging from transcription factors to MAP kinases, *Cell Res* 16, 681-692.
70. Yin, L., Dragnea, V., Bauer, C. E. (2012) PpsR, a Regulator of Heme and Bacteriochlorophyll Biosynthesis, Is a Heme-sensing Protein, *J Biol Chem* 287, 13850-13858.
71. Zhang, L. (2011) Heme, in *Heme biology : the secret life of heme in regulating diverse biological processes* (Zhang, L., Ed.), Kapitel 3, World Scientific, Singapore; Hackensack, NJ.
72. Kaasik, K., Lee, C. C. (2004) Reciprocal regulation of haem biosynthesis and the circadian clock in mammals, *Nature* 430, 467-471.
73. Raghuram, S., Stayrook, K. R., Huang, P. X., Rogers, P. M., Nosie, A. K., McClure, D. B., Burris, L. L., Khorasanizadeh, S., Burris, T. P., Rastinejad, F. (2007) Identification of heme as the ligand for the orphan nuclear receptors REV-ERB alpha and REV-ERB beta, *Nat Struct Mol Biol* 14, 1207-1213.
74. Boehning, D., Snyder, S. H. (2002) Circadian rhythms. Carbon monoxide and clocks, *Science* 298, 2339-2340.
75. Pardee, K. I., Xu, X. H., Reinking, J., Schuetz, A., Dong, A. P., Liu, S., Zhang, R. G., Tiefenbach, J., Lajoie, G., Plotnikov, A. N., Botchkarev, A., Krause, H. M., Edwards, A. (2009) The Structural Basis of Gas-Responsive Transcription by the Human Nuclear Hormone Receptor REV-ERB beta, *PLoS Biol* 7, 384-398.
76. Marvin, K. A., Reinking, J. L., Lee, A. J., Pardee, K., Krause, H. M., Burstyn, J. N. (2009) Nuclear receptors homo sapiens Rev-erbbeta and Drosophila melanogaster E75 are thiolate-ligated heme proteins which undergo redox-mediated ligand switching and bind CO and NO, *Biochemistry* 48, 7056-7071.
77. Chen, J.-J., Suragani, R. N. (2011) Heme-regulated eIF2 α kinase in translation and erythropoiesis, in *Heme biology : the secret life of heme in regulating diverse biological processes* (Zhang, L., Ed.), Kapitel 4, World Scientific, Singapore; Hackensack, NJ.

78. Barr, I., Smith, A. T., Senturia, R., Chen, Y. Q., Scheidemantle, B. D., Burstyn, J. N., Guo, F. (2011) DiGeorge Critical Region 8 (DGCR8) Is a Double-cysteine-ligated Heme Protein, *J Biol Chem* 286, 16716-16725.
79. Barr, I., Smith, A. T., Chen, Y., Senturia, R., Burstyn, J. N., Guo, F. (2012) Ferric, not ferrous, heme activates RNA-binding protein DGCR8 for primary microRNA processing, *Proc Natl Acad Sci U S A* 109, 1919-1924.
80. Yang, F., Xia, X. A., Lei, H. Y., Wang, E. D. (2010) Hemin Binds to Human Cytoplasmic Arginyl-tRNA Synthetase and Inhibits Its Catalytic Activity, *J Biol Chem* 285, 39437-39446.
81. Wakasugi, K. (2007) Human tryptophanyl-tRNA synthetase binds with heme to enhance its aminoacylation activity, *Biochemistry* 46, 11291-11298.
82. Roumenina, L. T., Radanova, M., Atanasov, B. P., Popov, K. T., Kaveri, S. V., Lacroix-Desmazes, S., Fremeaux-Bacchi, V., Dimitrov, J. D. (2011) Heme interacts with c1q and inhibits the classical complement pathway, *J Biol Chem* 286, 16459-16469.
83. Graca-Souza, A. V., Arruda, M. A. B., de Freitas, M. S., Barja-Fidalgo, C., Oliveira, P. L. (2002) Neutrophil activation by heme: implications for inflammatory processes, *Blood* 99, 4160-4165.
84. Aihara, Y., Jahromi, B. S., Yassari, R., Nikitina, E., Agbaje-Williams, M., Macdonald, R. L. (2004) Molecular profile of vascular ion channels after experimental subarachnoid hemorrhage, *J Cerebr Blood F Met* 24, 75-83.
85. Horrigan, F. T., Heinemann, S. H., Hoshi, T. (2005) Heme regulates allosteric activation of the Slo1 BK channel, *J Gen Physiol* 126, 7-21.
86. Yamaguchi, K., Ogita, K., Nakamura, S., Nishizuka, Y. (1995) The Protein-Kinase-C Isoforms Leading to Map-Kinase Activation in Cho Cells, *Biochem Biophys Res Commun* 210, 639-647.
87. Qiu, Z. H., Leslie, C. C. (1994) Protein Kinase C-Dependent and Kinase-C-Independent Pathways of Mitogen-Activated Protein-Kinase Activation in Macrophages by Stimuli That Activate Phospholipase-a(2), *J Biol Chem* 269, 19480-19487.
88. Ye, W. Z., Zhang, L. (2004) Heme controls the expression of cell cycle regulators and cell growth in HeLa cells, *Biochem Biophys Res Commun* 315, 546-554.
89. Yao, X., Balamurugan, P., Arvey, A., Leslie, C., Zhang, L. (2010) Heme controls the regulation of protein tyrosine kinases Jak2 and Src, *Biochem Biophys Res Commun* 403, 30-35.
90. Sahoo, N. (2012) Regulation von spannungsgesteuerten Kaliumkanälen durch Häm, *Dissertation, Friedrich-Schiller-Universität Jena*.

91. Yi, L., Morgan, J. T., Ragsdale, S. W. (2010) Identification of a thiol/disulfide redox switch in the human BK channel that controls its affinity for heme and CO, *J Biol Chem* 285, 20117-20127.
92. Atamna, H., Frey, W. H., 2nd. (2004) A role for heme in Alzheimer's disease: heme binds amyloid beta and has altered metabolism, *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 11153-11158.
93. Atamna, H., Boyle, K. (2006) Amyloid-beta peptide binds with heme to form a peroxidase: relationship to the cytopathologies of Alzheimer's disease, *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 3381-3386.
94. Howlett, D., Cutler, P., Heales, S., Camilleri, P. (1997) Hemin and related porphyrins inhibit beta-amyloid aggregation, *FEBS Lett* 417, 249-251.
95. Chernova, T., Steinert, J. R., Guerin, C. J., Nicotera, P., Forsythe, I. D., Smith, A. G. (2007) Neurite degeneration induced by heme deficiency mediated via inhibition of NMDA receptor-dependent extracellular signal-regulated kinase 1/2 activation, *J Neurosci* 27, 8475-8485.
96. Hardingham, G. E. (2006) Pro-survival signalling from the NMDA receptor, *Biochem Soc Trans* 34, 936-938.
97. Atamna, H., Walter, P. B., Ames, B. N. (2002) The role of heme and iron-sulfur clusters in mitochondrial biogenesis, maintenance, and decay with age, *Arch Biochem Biophys* 397, 345-353.
98. Kumar, S., Bandyopadhyay, U. (2005) Free heme toxicity and its detoxification systems in human, *Toxicol Lett* 157, 175-188.
99. Shibahara, S. (2003) The heme oxygenase dilemma in cellular homeostasis: new insights for the feedback regulation of heme catabolism, *Tohoku J Exp Med* 200, 167-186.
100. Ebert, P. S., Frykholm, B. C., Hess, R. A., Tschudy, D. P. (1981) Uptake of hematin and growth of malignant murine erythroleukemia cells depleted of endogenous heme by succinylacetone, *Cancer Res* 41, 937-941.
101. Worthington, M. T., Cohn, S. M., Miller, S. K., Luo, R. Q., Berg, C. L. (2001) Characterization of a human plasma membrane heme transporter in intestinal and hepatocyte cell lines, *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 280, G1172-1177.
102. Shayeghi, M., Latunde-Dada, G. O., Oakhill, J. S., Laftah, A. H., Takeuchi, K., Halliday, N., Khan, Y., Warley, A., McCann, F. E., Hider, R. C., Frazer, D. M., Anderson, G. J., Vulpe, C. D., Simpson, R. J., McKie, A. T. (2005) Identification of an intestinal heme transporter, *Cell* 122, 789-801.

103. Kranc, K. R., Pyne, G. J., Tao, L., Claridge, T. D., Harris, D. A., Cadoux-Hudson, T. A., Turnbull, J. J., Schofield, C. J., Clark, J. F. (2000) Oxidative degradation of bilirubin produces vasoactive compounds, *Eur J Biochem* 267, 7094-7101.
104. Matsuo, T., Yamaguchi, S., Mitsui, S., Emi, A., Shimoda, F., Okamura, H. (2003) Control mechanism of the circadian clock for timing of cell division in vivo, *Science* 302, 255-259.
105. Zhang, L., Arvey, A., Huynh, D. P., Leslie, C. (2011) The vast potential of heme in regulating biological processes, in *Heme biology : the secret life of heme in regulating diverse biological processes* (Zhang, L., Ed.), Kapitel 7, World Scientific, Singapore; Hackensack, NJ.
106. Smith, L. J., Kahraman, A., Thornton, J. M. (2010) Heme proteins-Diversity in structural characteristics, function, and folding, *Proteins* 78, 2349-2368.
107. Reedy, C. J., Gibney, B. R. (2004) Heme protein assemblies, *Chem Rev* 104, 617-649.
108. Rai, J., Raghothama, S., Sahal, D. (2007) Tyrosine-heme ligation in heme-peptide complex: design based on conserved motif of catalase, *J Pept Sci* 13, 406-412.
109. Roberts, S. A., Weichsel, A., Qiu, Y., Shelnutt, J. A., Walker, F. A., Montfort, W. R. (2001) Ligand-induced heme ruffling and bent no geometry in ultra-high-resolution structures of nitrophorin 4, *Biochemistry* 40, 11327-11337.
110. Arnoux, P., Haser, R., Izadi, N., Lecroisey, A., Delepierre, M., Wandersman, C., Czjzek, M. (1999) The crystal structure of HasA, a hemophore secreted by *Serratia marcescens*, *Nat Struct Biol* 6, 516-520.
111. Schneider, S., Marles-Wright, J., Sharp, K. H., Paoli, M. (2007) Diversity and conservation of interactions for binding heme in b-type heme proteins, *Nat Prod Rep* 24, 621-630.
112. Li, T., Bonkovsky, H. L., Guo, J. T. (2011) Structural analysis of heme proteins: implications for design and prediction, *BMC Struct Biol* 11, 1-13.
113. Goff, H., Morgan, L. O. (1976) Amino-Acid Substituted Iron Porphyrins .2. Thermodynamic Studies of Ligand-Binding, *Inorg Chem* 15, 2069-2076.
114. Lu, Y., Berry, S. M., Pfister, T. D. (2001) Engineering novel metalloproteins: Design of metal-binding sites into native protein scaffolds, *Chem Rev* 101, 3047-3080.
115. Uno, T., Yukinari, A., Tomisugi, Y., Ishikawa, Y., Makino, R., Brannigan, J. A., Wilkinson, A. J. (2001) Cysteine thiolate coordination in the ferrous CO complex of an engineered cytochrome b(562), *J Am Chem Soc* 123, 2458-2459.
116. Mcrec, D. E., Jensen, G. M., Fitzgerald, M. M., Siegel, H. A., Goodin, D. B. (1994) Construction of a Bisquo Heme Enzyme and Binding by Exogenous Ligands, *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 12847-12851.

117. Brunel, A., Wilson, A., Henry, L., Dorlet, P., Santolini, J. (2011) The Proximal Hydrogen Bond Network Modulates *Bacillus subtilis* Nitric-oxide Synthase Electronic and Structural Properties, *J Biol Chem* 286, 11997-12005.
118. Barker, P. D., Ferguson, S. J. (1999) Still a puzzle: why is haem covalently attached in c-type cytochromes?, *Structure* 7, R281-290.
119. Ishikawa, H., Nakagaki, M., Bamba, A., Uchida, T., Hori, H., O'Brian, M. R., Iwai, K., Ishimori, K. (2011) Unusual Heme Binding in the Bacterial Iron Response Regulator Protein: Spectral Characterization of Heme Binding to the Heme Regulatory Motif, *Biochemistry* 50, 1016-1022.
120. Battistuzzi, G., Bellei, M., Bortolotti, C. A., Sola, M. (2010) Redox properties of heme peroxidases, *Arch Biochem Biophys* 500, 21-36.
121. Banci, L. (1997) Structural properties of peroxidases, *J Biotechnol* 53, 253-263.
122. Ashokan, K. V., Mundaganur, D. S., Mundaganur, Y. D. (2011) Catalase: Phylogenetic characterization to explore protein cluster, *Journal of Research in Bioinformatics* 1, 1-8.
123. Jeoung, J. H., Pippig, D. A., Martins, B. M., Wagener, N., Dobbek, H. (2007) HTHP: a novel class of hexameric, tyrosine-coordinated heme proteins, *J Mol Biol* 368, 1122-1131.
124. Sigrist, C. J., Cerutti, L., de Castro, E., Langendijk-Genevaux, P. S., Bulliard, V., Bairoch, A., Hulo, N. (2010) PROSITE, a protein domain database for functional characterization and annotation, *Nucleic Acids Res* 38, D161-166.
125. Lanzilotta, W. N., Schuller, D. J., Thorsteinsson, M. V., Kerby, R. L., Roberts, G. P., Poulos, T. L. (2000) Structure of the CO sensing transcription activator *CooA*, *Nat Struct Biol* 7, 876-880.
126. Steiner, H., Kispal, G., Zollner, A., Haid, A., Neupert, W., Lill, R. (1996) Heme binding to a conserved Cys-Pro-Val motif is crucial for the catalytic function of mitochondrial heme lyases, *J Biol Chem* 271, 32605-32611.
127. Westberg, J. A., Jiang, J., Andersson, L. C. (2011) Stanniocalcin 1 binds hemin through a partially conserved heme regulatory motif, *Biochem Biophys Res Commun* 409, 266-269.
128. Goodfellow, B. J., Dias, J. S., Ferreira, G. C., Henklein, P., Wray, V., Macedo, A. L. (2001) The solution structure and heme binding of the presequence of murine 5-aminolevulinate synthase, *FEBS Lett* 505, 325-331.
129. Ogawa, K., Sun, J., Taketani, S., Nakajima, O., Nishitani, C., Sassa, S., Hayashi, N., Yamamoto, M., Shibahara, S., Fujita, H., Igarashi, K. (2001) Heme mediates derepression of Maf recognition element through direct binding to transcription repressor Bach1, *EMBO J* 20, 2835-2843.

130. McCoubrey, W. K., Huang, T. J., Maines, M. D. (1997) Heme oxygenase-2 is a hemoprotein and binds heme through heme regulatory motifs that are not involved in heme catalysis, *J Biol Chem* 272, 12568-12574.
131. Igarashi, J., Murase, M., Iizuka, A., Pichierri, F., Martinkova, M., Shimizu, T. (2008) Elucidation of the heme binding site of heme-regulated eukaryotic initiation factor 2 α kinase and the role of the regulatory motif in heme sensing by spectroscopic and catalytic studies of mutant proteins, *J Biol Chem* 283, 18782-18791.
132. Jiang, J., Westberg, J. A., Andersson, L. C. (2012) Stanniocalcin 2, forms a complex with heme oxygenase 1, binds hemin and is a heat shock protein, *Biochem Biophys Res Commun* 421, 274-279.
133. Sarre, T., Hilse, K. (1978) Control of Globin-Synthesis by Hemin-Controlled Translational Repressor in a Fractionated Cell-Free System from Rabbit Reticulocytes, *Eur J Biochem* 82, 123-131.
134. Sweeney, M. C., Wavreille, A. S., Park, J., Butchar, J. P., Tridandapani, S., Pei, D. (2005) Decoding protein-protein interactions through combinatorial chemistry: Sequence specificity of SHP-1, SHP-2, and SHIPSH2 domains, *Biochemistry* 44, 14932-14947.
135. Pirnau, A., Bogdan, M. (2008) Investigation of the interaction between naproxen and human serum albumin, *Romanian J Biophys* 18, 49-55.
136. Kühn, T., Sahoo, N., Nikolajski, M., Schlott, B., Heinemann, S. H., Imhof, D. (2011) Determination of Hemin-Binding Characteristics of Proteins by a Combinatorial Peptide Library Approach, *Chembiochem* 12, 2846-2855.
137. Kühn, T., Wißbrock, A., Goradia, N., Sahoo, N., Galler, K., Neugebauer, U., Popp, J., Heinemann, S. H., Ohlenschläger, O., Imhof, D. (2013) Analysis of Fe(III) heme binding to cysteine-containing heme-regulatory motifs in proteins, *ACS Chem Biol*, in press.
138. de Castro, E., Sigrist, C. J., Gattiker, A., Bulliard, V., Langendijk-Genevaux, P. S., Gasteiger, E., Bairoch, A., Hulo, N. (2006) ScanProsite: detection of PROSITE signature matches and ProRule-associated functional and structural residues in proteins, *Nucleic Acids Res* 34, W362-365.
139. Bjelke, J. R., Christensen, J., Nielsen, P. F., Branner, S., Kanstrup, A. B., Wagtmann, N., Rasmussen, H. B. (2006) Dipeptidyl peptidases 8 and 9: specificity and molecular characterization compared with dipeptidyl peptidase IV, *Biochem J* 396, 391-399.
140. Pitman, M. R., Menz, R. I., Abbott, C. A. (2010) Hydrophilic residues surrounding the S1 and S2 pockets contribute to dimerisation and catalysis in human dipeptidyl peptidase 8 (DP8), *Biol Chem* 391, 959-972.

141. Schneider, T. D., Stephens, R. M. (1990) Sequence logos: a new way to display consensus sequences, *Nucleic Acids Res* 18, 6097-6100.
142. Musharraf, A., Marksches, N., Teichmann, K., Pankratz, S., Landgraf, K., Englert, C., Imhof, D. (2008) Eyes absent proteins: characterization of substrate specificity and phosphatase activity of mutants associated with branchial, otic and renal anomalies, *Chembiochem* 9, 2285-2294.
143. Namuswe, F., Goldberg, D. P. (2006) A combinatorial approach to minimal peptide models of a metalloprotein active site, *Chem Commun (Camb)*, 2326-2328.
144. Albada, H. B., Liskamp, R. A. J. (2008) TAC-Scaffolded Tripeptides as Artificial Hydrolytic Receptors: A Combinatorial Approach Toward Esterase Mimics, *J Comb Chem* 10, 814-824.
145. Schmuck, C., Heil, M. (2003) Peptide binding by one-armed receptors in water: screening of a combinatorial library for the binding of Val-Val-Ile-Ala, *Chembiochem* 4, 1232-1238.
146. Imhof, D., Wavreille, A. S., May, A., Zacharias, M., Tridandapani, S., Pei, D. (2006) Sequence specificity of SHP-1 and SHP-2 Src homology 2 domains. Critical roles of residues beyond the pY+3 position, *J Biol Chem* 281, 20271-20282.
147. Miksanova, M., Igarashi, J., Minami, M., Sagami, I., Yamauchi, S., Kurokawa, H., Shimizu, T. (2006) Characterization of heme-regulated eIF2alpha kinase: roles of the N-terminal domain in the oligomeric state, heme binding, catalysis, and inhibition, *Biochemistry* 45, 9894-9905.
148. Nikolajski, M. (2008) Untersuchung der molekularen Basis der Interaktion von Häm und Hämabbauprodukten mit Ionenkanälen mit Hilfe peptidischer Modellverbindungen, *Diplomarbeit, Friedrich-Schiller-Universität Jena*.
149. Faller, M., Matsunaga, M., Yin, S., Loo, J. A., Guo, F. (2007) Heme is involved in microRNA processing, *Nat Struct Mol Biol* 14, 23-29.
150. Meier, M., Janosik, M., Kery, V., Kraus, J. P., Burkhard, P. (2001) Structure of human cystathionine beta-synthase: a unique pyridoxal 5'-phosphate-dependent heme protein, *EMBO J* 20, 3910-3916.
151. Martin, E., Sharina, I., Kots, A., Murad, F. (2003) A constitutively activated mutant of human soluble guanylyl cyclase (sGC): implication for the mechanism of sGC activation, *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 9208-9213.
152. Hu, S. Z., Morris, I. K., Singh, J. P., Smith, K. M., Spiro, T. G. (1993) Complete Assignment of Cytochrome-C Resonance Raman-Spectra Via Enzymatic Reconstitution with Isotopically Labeled Hemes, *J Am Chem Soc* 115, 12446-12458.

153. Spiro, T. G., Smulevich, G., Su, C. (1990) Probing Protein-Structure and Dynamics with Resonance Raman-Spectroscopy - Cytochrome-C Peroxidase and Hemoglobin, *Biochemistry* 29, 4497-4508.
154. Czernuszewicz, R. S., Macor, K. A., Li, X. Y., Kincaid, J. R., Spiro, T. G. (1989) Resonance Raman-Spectroscopy Reveals A_{1u} Vs A_{2u} Character and Pseudo-Jahn-Teller Distortion in Radical Cations of Ni^{III}, Cu^{II}, and Cl^{Fe} Octaethylporphyrins and Tetraphenylporphyrins, *J Am Chem Soc* 111, 3860-3869.
155. Misiunas, A., Niaura, G., Barauskas, J., Meskys, R., Rutkiene, R., Razumas, V., Nylander, T. (2012) Horse heart cytochrome c entrapped into the hydrated liquid-crystalline phases of phytantriol: X-ray diffraction and Raman spectroscopic characterization, *J Colloid Interf Sci* 378, 232-240.
156. Schwarzing, S., Kroon, G. J., Foss, T. R., Chung, J., Wright, P. E., Dyson, H. J. (2001) Sequence-dependent correction of random coil NMR chemical shifts, *J Am Chem Soc* 123, 2970-2978.
157. Berjanskii, M. V., Wishart, D. S. (2005) A simple method to predict protein flexibility using secondary chemical shifts, *J Am Chem Soc* 127, 14970-14971.
158. Smith, A. T., Majtan, T., Freeman, K. M., Su, Y., Kraus, J. P., Burstyn, J. N. (2011) Cobalt cystathionine beta-synthase: a cobalt-substituted heme protein with a unique thiolate ligation motif, *Inorg Chem* 50, 4417-4427.
159. Pinter, T. B., Dodd, E. L., Bohle, D. S., Stillman, M. J. (2012) Spectroscopic and theoretical studies of Ga(III)protoporphyrin-IX and its reactions with myoglobin, *Inorg Chem* 51, 3743-3753.
160. Gorrell, M. D. (2005) Dipeptidyl peptidase IV and related enzymes in cell biology and liver disorders, *Clin Sci (Lond)* 108, 277-292.
161. Abbott, C. A., Yu, D. M., Woollatt, E., Sutherland, G. R., McCaughan, G. W., Gorrell, M. D. (2000) Cloning, expression and chromosomal localization of a novel human dipeptidyl peptidase (DPP) IV homolog, DPP8, *Eur J Biochem* 267, 6140-6150.
162. Jones, J. H. (2006) Abbreviations and symbols in peptide science: a revised guide and commentary, *J Pept Sci* 12, 1-12.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen danken, die mir diese Arbeit ermöglichten und mich dabei unterstützten.

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Diana Imhof für die ausgezeichnete Betreuung meiner Arbeiten und Unterstützung in allen Lebenslagen. Ihre motivierende Art und der Ehrgeiz für die Wissenschaft haben mich auf meinem Weg voran und immer wieder auf die richtige Spur zurückgebracht. Ich möchte ihr für die vielen produktiven Diskussionen danken, die uns beide Nerven gekostet haben, am Ende aber immer ausgezeichnete Pläne und Ergebnisse hervorbrachten, ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Ich danke Prof. Dr. Stefan H. Heinemann, der es geschafft hat, ein anregendes und stark vernetztes Forschungsumfeld zu schaffen, das zahlreiche, für diese Arbeit relevante Verknüpfungen ermöglichte. Die regelmäßigen Kommentare und Diskussionen lieferten neue Denkansätze, die für die Generierung dieser Arbeit sehr hilfreich waren. In Zusammenarbeit mit Dr. Nirakar Sahoo möchte ich beiden für die Durchführung und Bereitstellung der Daten aus den elektrophysiologischen Studien danken.

Für die Strukturuntersuchungen mittels NMR-Spektroskopie möchte ich Dr. Oliver Ohlenschläger und Nishit Goradia meinen Dank aussprechen. Einen wichtigen Beitrag haben auch Dr. Ute Neugebauer und Kerstin Galler sowie Prof. Dr. Jürgen Popp zu dieser Arbeit geleistet, denen ich in erster Linie für die Messungen der Ramanspektren danken möchte, aber auch für die Bereitstellung eines UV/Vis-Spektrometers in der Anfangsphase meiner Arbeiten. Prof. Dr. Olav Schiemann danke ich für die Bereitstellung des UV/Vis-Geräts, sowie Marianne Engeser für die Bereitstellung eines MALDI-TOF-Massenspektrometers in Bonn. Ich danke außerdem Dr. Bernhard Schlott und Anita Willitzer für die Unterstützung bei den Studien zum Edman-Abbau sowie die Bereitstellung des Protein Sequencers. Für die Möglichkeit in der ersten Hälfte meiner Promotionszeit die notwendigen Arbeiten am Institut für Biochemie und Biophysik an der FSU Jena durchführen zu können, bedanke ich mich bei Prof. Dr. Thorsten Heinzel.

In aller Dankbarkeit wende ich mich an die Mitglieder meiner Arbeitsgruppe, frühere wie jetzige, die mich auf meinem Weg begleitet und unterstützt haben und mir stets eine große Hilfe waren in persönlichen sowie beruflichen Lebenslagen. Namentlich seien daher Dr. Kathleen Teichmann, Dr. Alesia Miloslavina, Miriam Böhm, Amelie Wißbrock, Dorle Hennig, Pascal Heimer, Henning Brewitz, Ming Chen sowie Alice Vogel erwähnt.

Zu guter letzt danke ich meinem Mann Patrick Kühl und meinen (stets besorgten) Eltern und Geschwistern sowie allen meinen Freunden, die mich mit all ihrer Liebe und Zuneigung immer unterstützt und mit ihrer unglaublichen Geduld bewahrt und aufgebaut haben. Vielen, vielen Dank dafür!

Lebenslauf**Persönliche Daten**

Name	Toni Kühl
Anschrift	Londoner Straße 24, 53117 Bonn
Geburtsdatum	19.03.1985
Staatsangehörigkeit	Deutsch
Familienstand	verheiratet

Ausbildung

1991-1997	6. Grundschule Eberswalde
1997-2004	Alexander-von-Humboldt-Gymnasium in Eberswalde
06/2004	Abschluss mit dem Abitur
2004-2009	Studium der Biochemie, Friedrich-Schiller-Universität Jena Diplomarbeit in der Arbeitsgruppe „Peptidchemie“ im Institut für Biochemie und Biophysik, CMB Jena, Friedrich-Schiller-Universität Jena bei PD Dr. D. Imhof Thema: „Untersuchungen zur Darstellung des Faktor XIIIa-Inhibitors Tridegin durch Festphasenpeptidsynthese und chemische Ligation“
06/2009	Abschluss als Diplombiochemiker
06/2009-09/2011	Promotion in der Arbeitsgruppe „Peptidchemie“ im Institut für Biochemie und Biophysik, CMB Jena, Friedrich-Schiller-Universität Jena bei Prof. Dr. D. Imhof
10/2011-05/2013	Fortsetzung der Promotion im Pharmazeutischen Institut, Pharmazeutische Chemie I, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn bei Prof. Dr. D. Imhof Thema: „Funktionelle und strukturelle Untersuchungen von Häm-Peptid/Protein-Komplexen: Ein Beitrag zur Aufklärung der Häm-vermittelten Regulation von Proteinen im Organismus“

Tätigkeiten

04/2007-06/2007	Studentische Hilfskraft in der Arbeitsgruppe „Peptidchemie“ bei PD Dr. D. Imhof an der Friedrich-Schiller-Universität Jena
04/2009-05/2009	Studentische Hilfskraft in der Arbeitsgruppe „Peptidchemie“ bei PD Dr. D. Imhof an der Friedrich-Schiller-Universität Jena

Liste der wissenschaftlichen Publikationen und Vorträge

Publikationen

Teichmann, K., Kühl, T., König, I., Wieligmann, K., Zacharias, M., Imhof, D. (2010) Modulation of SHP-1 phosphatase activity by monovalent and bivalent SH2 phosphopeptide ligands, *Biopolymers* 93, 102-112.

Kühl, T., Sahoo, N., Nikolajski, M., Schlott, B., Heinemann, S. H., Imhof, D. (2011) Determination of Hemin-Binding Characteristics of Proteins by a Combinatorial Peptide Library Approach, *ChemBioChem* 12, 2846-2855.

Böhm, M.*, Kühl, T.*, Harges, K., Coch, R., Arkona, C., Schlott, B., Steinmetzer, T., Imhof, D. (2012) Synthesis and Functional Characterization of Tridegin and Its Analogues: Inhibitors and Substrates of Factor XIIIa, *ChemMedChem* 7, 326-333.

*Beide Autoren sind gleichrangig an der Publikation beteiligt.

Tietze, A., Tietze, D., Ohlenschläger, O., Leipold, E., Ullrich, F., Kühl, T., Mischo, A., Buntkowsky, G., Görlach, M., Heinemann, S. H., Imhof, D. (2012) Structurally diverse μ -conotoxin PIIIA isomers block sodium channel Na_v1.4, *Angew. Chem.* 51, 4058-4061.

Kühl, T., Wißbrock, A., Goradia, N., Sahoo, N., Galler, K., Neugebauer, U., Popp J., Heinemann, S. H., Ohlenschläger, O., Imhof, D. (2013) Analysis of Fe(III) heme binding to cysteine-containing heme-regulatory motifs in proteins, *ACS Chem. Biol.*, in press.

Posterbeiträge und-präsentationen

Kühl, T., Coch, R., Arkona, C., Schlott, B., Steinmetzer, T., Imhof, D (2010) Tridegin – insights into the synthesis and bioactivity of a factor XIIIa-inhibitor, 31. *Europäisches Peptidsymposium*, Kopenhagen.

Kühl, T., Nikolajski, M., Sahoo, N., Schlott, B., Heinemann, S. H., Imhof, D. (2010) Determination of heme binding motifs by a combinatorial peptide library approach, 31. *Europäisches Peptidsymposium*, Kopenhagen.

Kühl, T., Böhm, M., Tietze, A., Imhof, D. (2011) Native Chemical Ligation and Oxidation in Ionic Liquids, *Workshop SPP1191*, Heimerzheim.

Kühl, T., Wißbrock, A., Goradia, N., Sahoo, N., Galler, K., Neugebauer, U., Popp, J., Heinemann, S. H., Ohlenschläger, O., Imhof, D. (2013) Analysis of heme binding to cysteine-containing heme-regulatory motifs in proteins, *11. Deutsches Peptidsymposium*, Garching (München).

Böhm, M., Kühl, T., Imhof, D. (2013) Targeting the final step of blood coagulation: Tridegin as a valuable tool to inhibit FXIIIa, *11. Deutsches Peptidsymposium*, Garching (München).

Chen, M., Kühl, T., Teichmann, K., Imhof, D. (2013) Ionic liquids as alternative solvents for the ligation of cysteine-containing peptide fragments, *11. Deutsches Peptidsymposium*, Garching (München).

Kühl, T., Goradia, N., Ohlenschläger, O., Imhof, D. (2013) Binding of heme to peptides and proteins: structural and functional investigations, *2. Internationales HHDP Symposium*, Jena.

Kühl, T., Galler, K., Popp, J., Neugebauer, U., Imhof, D. (2013) Application of Raman spectroscopy for the characterization of heme-binding to peptides, *2. Internationales HHDP Symposium*, Jena.

Wissenschaftliche Vorträge

Kühl, T., Coch, R., Haumann, S. (2011) Native Chemical Ligation in Ionic Liquids, *Workshop SPP1191*, Heimerzheim.

Kühl, T., Wißbrock, A. (2012) A first glance at heme binding to CP-motifs, *Retreat FOR1738*, Siegmundsburg.

Jena, den 27. November 2013

Unterschrift

Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass mir die Promotionsordnung der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität Jena vom 4. Dezember 2012 bekannt ist.

Ferner erkläre ich, dass ich die hier vorliegende Arbeit ohne zulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus den anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Konzepte und Daten sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet.

Bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie der Anfertigung des Manuskripts haben mir keine Personen geholfen.

Weitere Personen waren an der inhaltlich-materiellen Erstellung der Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich hierfür nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten in Anspruch genommen. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Arbeit stehen.

Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Ferner erkläre ich, dass ich mich mit der vorliegenden Arbeit an keiner anderen Hochschule um den akademischen Grad Doctor rerum naturalium beworben habe und dass ich weder früher noch gegenwärtig die Eröffnung eines Verfahrens zum Erwerb des oben genannten akademischen Grades an einer Hochschule beantragt habe.

Ich versichere, dass ich nach bestem Wissen die reine Wahrheit gesagt und nichts verschwiegen habe.

Jena, den 27. November 2013

Unterschrift